

RAPD マーカーを利用したマツノザイセンチュウ
抵抗性クロマツ採種園の遺伝子管理

後藤 晋

目次

第1章 緒言

1. はじめに	1
2. 採種園の概念	1
3. 採種園の管理	2
4. 採種園における管理上の問題点	9
5. マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園の歴史的経緯	14
6. マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園における課題	17
7. 本論文の構成	18

第2章 RAPD マーカーを利用した採種園の遺伝子管理技術の開発

第1節 序	20
第2節 RAPD マーカーの表現型によるクローン識別法の開発	
2. 2. 1 はじめに	21
2. 2. 2 材料と方法	22
2. 2. 3 結果	28
2. 2. 4 考察	30
第3節 クローン識別法の簡便化（バルク分析）	
2. 3. 1 はじめに	36
2. 3. 2 材料と方法	36
2. 3. 3 結果	38
2. 3. 4 考察	41
第4節 採種園産種苗の花粉親識別法の開発	
2. 4. 1 はじめに	46
2. 4. 2 材料と方法	47
2. 4. 3 結果	51
2. 4. 4 考察	54
第5節 結論	58

第3章 遺伝子管理技術の適用による採種園の実態解明	
第1節 序	60
第2節 鹿児島県採種園におけるクローン管理の実態	
3. 2. 1 はじめに	61
3. 2. 2 材料と方法	61
3. 2. 3 結果	62
3. 2. 4 考察	62
第3節 福岡県採種園におけるクローン管理の実態	
3. 3. 1 はじめに	67
3. 3. 2 材料と方法	67
3. 3. 3 結果	69
3. 3. 4 考察	73
第4節 福岡県採種園における交配実態	
3. 4. 1 はじめに	76
3. 4. 2 材料と方法	76
3. 4. 3 結果	77
3. 4. 4 考察	79
第5節 結論	83
第4章 採種園構成クローンの母親および花粉親としての遺伝的評価	
第1節 序	85
第2節 採種園産種子に対する母親としての寄与	
4. 2. 1 はじめに	86
4. 2. 2 材料と方法	86
4. 2. 3 結果	87
4. 2. 4 考察	90
第3節 採種園産実生苗に対する花粉親としての寄与	
4. 3. 1 はじめに	94
4. 3. 2 材料と方法	94
4. 3. 3 結果	96

4. 3. 4 考察	106
第4節 次世代抵抗性に対する母親および花粉親としての寄与	
4. 4. 1 はじめに	111
4. 4. 2 材料と方法	112
4. 4. 3 結果	112
4. 4. 4 考察	115
第5節 結論	121
第5章 総合考察	
1. 採種園の遺伝子管理における RAPD マーカーの有効性	123
2. 採種園における交配様式	125
3. 採種園における遺伝子管理についての具体的提案	127
謝辞	132
引用文献	133
付表	148

第1章 緒言

1. はじめに

我が国のマツ林に深刻な被害をもたらしたマツノザイセンチュウ病に対する対策の一つとして、本病に抵抗性を有するアカマツ(*Pinus densiflora*)とクロマツ(*Pinus thunbergii*)の個体選抜が行われ、それらの接ぎ木個体を利用した採種園が全国各地に造成されており、今日これらの採種園から事業的規模で抵抗性種苗が生産されるに至っている。これらの採種園において遺伝的改良効果を十分に発揮させるためには、生産される種苗に対して各構成個体が遺伝的に均等に寄与できるよう、採種園自体あるいは採種園構成個体が適切に管理される必要がある。しかし、個体の遺伝子型の判別や交配実態の直接的な解明に有効な手法は限られており、採種園種苗の遺伝的性質を人為的にコントロールすること、すなわち遺伝子管理はこれまで不可能であった。一方、近年、DNA 分子マーカー等を利用した個体の遺伝子型分析技術が一般化しつつあり、この応用による遺伝子管理の実現が望まれている。このような背景に立って、本論文では、DNA 分子マーカーの一つである RAPD マーカーを主に用いた、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園の遺伝子管理に資する研究を行った。

2. 採種園の概念

採種園は、「遺伝的に優れた選抜個体を未選抜集団からの花粉汚染が発生しないよう隔離植栽し、大量の改良種子を安定的かつ豊富に生産するために意図的に管理される人工林」として定義される (Zobel *et al.*, 1958; Zobel and McElwee, 1964)。したがって、採種園は、得られる種子の遺伝的品質や経済的効果の点から、天然および人工の優良林分を採種用に指定した採種林 (Seed stands; Seed production area) とは明確に区別される (Larsen, 1956; Zobel *et al.*, 1958; Zobel and Talbert, 1984)。採種園のアイデアは古くから存在し、ヨーロッパでは 1900 年代の初めから採種園を用いた種子生産に関する議論が行われている (Feilberg and Sjøgaard, 1975)。1928 年に Bates は、遺伝的に選抜された実生集団を用いた種子生産の場を "Tree seed farms" として提唱した。Larsen (1956) は、遺伝的に選抜された個体を栄養繁殖したクローン集団か、選抜個体間の人工交配による実生集団を用いた種子生産の場として、現在一般的に用いられている "Seed orchard" という用語を初めて用いた。我が国でも、種子生産を目的とする樹木園であるから、いわば果実を生産するための果樹

園のようなものであるとして、「採種園」という用語が用いられている(古越・谷口, 1982)。

採種園は、構成する個体の遺伝組成によって、選抜された個体を栄養繁殖して構成個体とするクローン採種園 (Vegetative seed orchard; Clonal seed orchard) と選抜個体の実生次代を構成個体とする実生採種園 (Seedling seed orchard) の2つに大別される (Zobel and Talbert, 1984)。このうち、選抜個体の遺伝的獲得量においてより優れているとされるクローン採種園が、第2次大戦以後、世界的に普及した (Toda, 1964)。その後、Wright (1976) は、次代検定 (Progeny tests) と種子生産を同時に行うことのできる実生採種園を提唱し、これらの採種園の得失と選択に関する議論が活発に行われた (Barber and Dorman, 1964; Giertych, 1975; Wright, 1976)。Toda (1964) は、これらの議論に関する総合的な考察を行い、相対的な遺伝的獲得量やコストは目的形質の遺伝性、栄養繁殖および人工交配の難易度などによって大きく異なること、一般的にはクローン採種園が推奨されることなどを述べている。我が国の林木育種は集団選抜法 (mass selection) によって進められており、1930年代にスウェーデンで開発された精英樹選抜育種 (Lindquist, 1948) を基本としている。すなわち、地域別に多数の精英樹を選抜し、接ぎ木苗または挿し木苗による採種園および採穂園 (Cutting garden) を造成し、造林事業用の種苗生産を開始する方法である (大庭・勝田, 1991)。我が国の精英樹採種園のほとんどはクローン採種園であり (古越・谷口, 1982)、育種種苗を計画的に生産するために各都道府県をはじめ営林局や企業には採種園が設定され、平成9年度現在の精英樹採種園は全国 469 箇所、1,274ha に達している (林木育種センター, 1999)。

3. 採種園の管理

採種園の育種種子の供給源としての普及とともに、採種園をより理想的な状態に近づけるために、採種園の管理に関する様々な研究が進められた。より理想的な採種園とは、1) 大量の種子を安定的かつ容易に生産できること、2) 遺伝的に優れた個体を正確に配置し管理すること、3) 外部からの花粉汚染を防止し、遺伝的品質の高い種子を生産すること、の3つに集約される。ここでは、これらの実現のために行われてきた採種園管理に関する主な研究について述べる。

1) 大量の種子を安定的かつ容易に生産する

設定場所：採種園の利用が一般的になるにつれて、採種園を設定する場所により、生産

される種子の量が大きく異なることが明らかになってきた。そこで、設定場所による着花性や種子生産量の違いが調査された。Sweet(1975)は、ニュージーランドの 129 ヶ所に設定された Radiata pine(*Pinus radiata*)の試験地で球果生産量を調査し、場所によって球果生産量に 10 倍もの差が生じることを示した。このような着花性あるいは種子生産量の違いは、地理的な位置が樹木の生理特性に大きな影響を与えることに起因している(Werner, 1975)。緯度は地理的位置の主要な成分であり、日長条件と密接な関係を持つ(Enescu, 1987)。日長条件が花芽分化を制御することは、いくつかの実験により確かめられている。Longman(1982)は、3 年生の Lodgepole pine(*Pinus contorta*)の挿し木苗を人工気象室内で育成し、11 週間の短日処理(10 時間日長)を行うことにより、長日処理(19.5 時間日長)を行った場合の 6 倍の雌花数を認めた。長尾・佐々木(1985)は、2~3 年生のヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)の実生苗と挿し木苗を用いて、人工気象室内で様々な長日処理を行い、主明期が 14 時間以上あれば補光することにより花芽形成を誘導できることを確かめた。温度は、緯度と同様に開花と種子生産に大きな影響を与える。柳原ら(1960)は、49 年間の気候条件とカラマツ(*Larix kaempferi*)の開花結実状況を調査し、6 月と 7 月の高い気温とその期間の少ない降水量が翌年の球果生産に影響を与えている事実を突き止めた。

生物学的な見地からすると、採種園は対象樹種が自生する地理的範囲の主要な場所に設定されるのが安全である(Zobel and Talbert, 1984)。しかし、もともと厳しい気候環境の産地から選ばれた個体を穏やかな気候環境に移すことで、種子生産量を増大させたり、開花までの期間を短縮する効果が認められている(Werner, 1975)。Schmidtling(1984)は、Shortleaf pine(*Pinus echinata*)と Virginia pine(*Pinus virginiana*)の 2 種について、北部産地のクローンを南部のクローン集植所にも植栽し、調査した 3 年間にわたり、南部の方が北部よりも球果生産量が 2 倍以上であったとした。一方、Schmidtling(1987)は、Loblolly pine(*Pinus taeda*)を自生範囲から 200km 南方の南フロリダ地域に植栽した場合、その開花期に異常が発生することを認めており、温帯性樹種の亜熱帯あるいは熱帯地方への長距離の移動は避けた方がよいとしている。いずれにしても、自生範囲を越えた採種園の設定は十分な調査が必要であり、慎重に行うべきであると考えられる(Werner, 1975)。

施肥管理：採種園では、構成個体の結実をできるだけ早めるとともに、安定的な種子生産を行う必要がある。そこで、施肥(Fertilization)が樹体の着花性に与える影響に関する研究が行われた。開花結実には、C/N 比が重要である(畑野・佐々木, 1987)。右田(1960)は、スギ(*Cryptomeria japonica*)の 3 年生苗を異なる条件下で流水に浸し、各処理区におけ

る花芽着生数を調べた。その結果、最も花芽着生数が多かった処理区の苗木の C/N 比が他の 2 区の苗木と比べて高かったとした。一般に、窒素肥料とリン酸肥料の適切な施用は着花を促進することが知られている（畑野・佐々木, 1987; 大庭・勝田, 1991）。Steinbrenner ら（1960）は、20 年生の Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) の人工林で 2 年間の施肥試験を行い、施肥区では無処理区の 2 倍以上の個体に雌花が着生したとした。高山（1967）は、9 ～ 10 年生のアカツキ英樹クローンの接ぎ木苗に施肥試験を行い、施肥区では調査した 4 年間は常に無処理区に比べて著しく種子生産量が多く、最大で 75 倍になったとした。Hattemer ら（1977）は、4 ～ 5 年生の Scots pine (*Pinus sylvestris*) の接ぎ木苗に施肥試験を行い、各個体当たりの球果数が施肥区では無処理区の約 3 倍になったとした。したがって、採種園では、構成個体の結実促進や種子生産の安定化を行う上で、対象樹種や造成してから時期に応じた施肥を実施する必要がある（百瀬, 1969）と考えられる。

着花制御：採種園における着花制御は、安定的かつ豊富な種子生産のために重要な管理技術である。針葉樹の着花促進には、植物ホルモンの一つであるジベレリン（Gibberellin）が有効であることがよく知られている（Bonnet-Masimbert, 1987; Pharis *et al.*, 1987）。我が国のジベレリン（GA₃）の林業樹種に対する適用は、加藤ら（1958）の報告が最初である。加藤ら（1958）は、GA₃ 水溶液（50ppm）を苗高わずか 2 cm のスギ当年生稚苗の頂芽に滴下し、2 回の処理で 26.3 % の個体に着花が認められたとした。その後、スギに対する GA₃ 水溶液の着花促進効果に関して、数多くの実験が行われた。橋詰（1959）は、当年生のスギ実生苗および挿し木苗に GA₃ 水溶液（10 ～ 200ppm）を葉面散布し、50ppm の水溶液で当年生実生苗と挿し木苗に雌花と雄花の両方が着花すること、GA₃ 水溶液によって着花した雄花の花粉に発芽能力があることなどを確かめた。加藤（1959）は、GA₃ 処理の時期、処理木の年齢、水溶液の濃度などに関する試験を行い、ジベレリンの適用時期は花芽分化時期の 1 ～ 2 週間前がよいこと、処理木は実生苗では 5 年生以上、挿し木および接ぎ木苗では 3 年生以上の場合に効果が高いこと、1 回の葉面散布を行う場合には 300ppm の濃度で十分な花芽数が得られること、などを明らかにした。さらに、GA₃ 水溶液は、スギ科およびヒノキ科の多くの樹種の花芽分化を促進することが明らかにされ（加藤ら, 1959; 橋詰, 1968）、スギやヒノキの採種園でも事業的な着花促進処理にしばしば用いられるようになった。金川・桑原（1984）は、11 県のスギ採種園において事業的に行われた GA₃ 水溶液（50ppm）の葉面散布の結果を取りまとめ、GA₃ 処理区では着花数（特に、雌花数）が著しく増加すること、また、各クローンの種子生産に対する寄与率の平準化が図れるこ

とを示した。また、金川・北川（1987）は、19 県のヒノキ採種園において事業的に行われた GA₃ の葉面散布および包埋処理の結果を取りまとめ、15mg の包埋処理をした場合、無処理区に比べて雌花数では 4.5 倍～8.6 倍、雄花数では 3.9 倍～9.3 倍に着花数が著しく増加することを認め、GA₃ 処理が豊凶の影響を緩和する可能性を指摘した。

GA₃ はマツ科樹種には効果が少ないとされていたが（加藤ら, 1959; 橋詰, 1968）、極性の低いジベレリン（GA₄, GA₄₊₇, GA₉）がマツ科樹種の着花促進に効果があることが後に知られるようになった（Pharis and Kuo, 1977; Bonnet-Masimbert, 1987; Pharis *et al.*, 1987）。金川（1979）は、8 年生のクロマツ精英樹クローン接ぎ木苗に GA₄₊₇ の包埋処理を行い、雄花数が無処理に比べて 3.2 ～ 4.5 倍に向上したとした。Puritch ら（1979）は、8 ～ 11 年生の Douglas-fir の実生苗および接ぎ木苗に GA_{4,7,9} の混合ジベレリンによる処理を行い、無処理の場合に比べて球果数は 3 倍以上になったが、雄花数に変化は見られなかったとした。Cecich(1980)は、播種後 17 ヶ月と 19 ヶ月の Jack pine(*Pinus banksiana*)の実生苗に GA₄₊₇ 処理を行った場合、雌花数は無処理の場合の 4 倍に向上したが、15 ヶ月の実生苗では着花が認められなかったとした。Chalupka(1980)は、17 年生の Scots pine の接ぎ木苗に GA₄₊₇ 処理を行った場合、無処理の場合に比べて、雌花数は 2 倍以上に、雌花を着生した枝の割合は無処理の場合の 3 倍になったが、GA₃ 処理を行った場合は雄花の着生に負の効果が生じたとした。Bonnet-Masimbert(1982)は、5, 7 年生のカラマツと European larch (*Larix decidua*)の実生苗に GA₄₊₇ 処理を行い、無処理の場合と比べて、雄花数が 2 倍、雌花数が 8 倍になったとした。Kanekawa and Katsuta(1982)は、採種園内のアカマツおよびクロマツ 7 ～ 8 年生の接ぎ木クローンに 20mg の GA₄₊₇ 包埋処理を行い、アカマツでは雌花と雄花、クロマツでは雄花の着花促進に効果があったとした。戸田ら(1993)は、クロマツ接ぎ木クローンに対して GA₄₊₇ 包埋処理を行い、無処理に比べて 7 倍の雄花の着生を認めた。以上の研究結果から、適切なジベレリン処理を行うことによって、採種園における種子生産の安定化、あるいは各クローンの種子生産に対する寄与の平準化を行うことが期待できると考えられる。

採種園の保護：昆虫、樹病、気象害などからの採種園の保護は、安定的な種子生産に欠かすことができない。特に、花、球果、種子などの生殖器官を加害する昆虫類は、採種園にとって最も深刻なダメージをもたらし、時には 50 %以上の種子が失われることもある（Dinus and Yates, 1975）。我が国では、果樹園の害虫であったカメムシ類によるスギやヒノキ採種園の被害が深刻である。小林・横山（1984）は、茨城県のスギ採種園では約 30

%の種子がカメムシ被害を受けていたとした。吉野・田畑（1989）は、兵庫県のヒノキ採種園では約 50 %の種子がカメムシによる被害を受けていたとした。また、佐野（1997）は、静岡県ヒノキ採種園におけるカメムシ被害を4年間調査し、カメムシ被害がヒノキ発芽率の年次変動に関与している可能性を示した。これらの被害に対して、吉野・田畑（1989）は、交配袋をヒノキ球果にかぶせることにより 5.6 倍の発芽率の向上が認められることを示した。宮原ら（1989）は、福岡県のヒノキ採種園において、有機リン酸系の殺虫剤による処理とメッシュ袋による袋掛け処理を行い、ヒノキ種子の発芽率が、無処理の場合に比べて、それぞれ 1.6 倍と 3.6 倍に向上したとした。吉野・谷口（1991）は、兵庫県のスギ採種園において袋掛けをすることにより、無処理の場合に比べて発芽率が 1.3 ～ 2.6 倍に向上したとした。川尻ら（1992）は、玉ねぎ用ネットをヒノキ球果にかけることにより、ヒノキ種子の発芽率が無処理の場合の 5 倍以上に向上したとした。このように、カメムシの被害に対しては、通気性のよい袋を球果にかけることにより、発芽率を損なわずに、ほぼ完全な防除ができるようになった。Bramlett(1987)は、14 年生の Loblolly pine の採種園を例にとり、何も保護対策が講じられない場合、潜在的な生産量の 10 %しか種子が得られないが、適切な保護を行うことによって潜在量の最大 50 %まで得ることができるようになると指摘した。したがって、採種園では、諸被害の原因を究明するとともに、早急かつ適切な保護対策を講ずることが重要であると考えられる。

2) 遺伝的に優れた個体を正確に配置する

クローン増殖：クローン採種園の造成には、選抜された個体を栄養繁殖する技術が必要となる。接ぎ木苗では着花開始年数が早まることが知られており(Hattemer *et al.*, 1977)、採種園には有利である。また、選抜される対象木は高齢で挿し木増殖が困難である場合が多いため、一部の樹種を除き、クローン採種園の構成個体にはしばしば接ぎ木苗が用いられる(Hong, 1975)。そこで、構成樹種に適応した接ぎ木方法や接ぎ木後の保育管理などが検討された(Zobel *et al.*, 1958; 中平・染郷, 1973; Hong, 1975; Wright, 1976)。樹種やクローンによっては、接ぎ木不親和を生じるものもあり、採種園造成上の大きな問題となることもある(Hong, 1975; Wright, 1976)。そこで、接ぎ穂と台木の関係が接ぎ木不親和性に与える影響が調査された。榎本（1969）は、スギ品種（クモトオシ）の挿し木苗を共通の台木として、スギ精英樹 51 クローンを接ぎ木し、半数以上に接ぎ木不親和が認められたとし、百瀬（1971）は追試験によってそのことを確かめた。Slee and Spidy(1970)は、*Pinus caribaea*

の接ぎ木において、接ぎ穂クローンの実生後代を台木に用いることにより接ぎ木不親和性の発現を抑制することができたとした。一方で、Slee and Spidy(1970)は、接ぎ木不親和性が著しいクローンでは、その効果は充分ではなかったことも示している。Douglas-fir のように、接ぎ木をしてから長い年月を経過した後に接ぎ木不親和が現れる樹種では、接ぎ木不親和性の早期検定法の開発が行われている(Hong, 1975; 福原・荒井, 1979)。

クローン配置法：クローン採種園では、同一クローンのラメート間による自殖を少なくし、任意に交配ができるように設計する必要がある(Giertych, 1975; Zobel and Talbert, 1984)。そのためには、同一クローンが隣接もしくは近接しないように、さらに、本数調整のための間伐を行った後も採種園全体のクローン構成が変わらないような配置が求められる。完全ランダム配置(Completely Random design)は、同一クローンのラメートが隣接しないように配慮して、採種園を構成する全個体を完全に無作為に配置する方法であるが、実際の植栽、現場での接ぎ木、補植などが困難である(Giertych, 1975)。ランダム完全ブロック配置(Randmised Complete-block design)は、各ブロック内は同一クローンのラメートが隣接しないようにランダムに配置し、しかもブロック間の接触面で同一クローンのラメートが隣接しないように調整する方法で、採種園造成後の規則的な間伐に対応できるという長所がある(Giertych, 1975)。不均衡不完全ブロック配置(Unbalanced Incomplete-block design)は、Langner and Stern(1955)によって推奨され、クローン数にかかわらず固定した数の個体を各ブロックに配置し、ブロック内のクローンの組合せが偏らないように調整し、ブロック間の接触面とブロック内の個体間で同一クローンのラメートが隣接しないようにランダムに配置する方法である。この配置法は、任意交配が起こりやすくクローン特性を検定するのにも適しているが、クローン数とクローン当たりのラメート数が限定され、規則的な間伐が適用しにくいという難点がある。Freeman(1969)は、この不均衡不完全ブロック配置の改良型として、各ブロック内の個体数を4にして方形に配置する循環型均衡不完全ブロック配置(Cyclic Balanced Incompleted-block design)を考案し、クローン数が18～21, 24, 31-34の場合を新たに設計した。また、交配時期に一定方向から風が吹いている場合に適した方法として、Freeman(1967)は、指向性循環均衡不完全ブロック配置(Directional Cyclic Balanced Incomplete-block design)を考案した。この方法では、3列の中央を採種列として、採種列の風上3方向の個体が花粉親として寄与できるよう設計されている。均衡格子配置(Balanced Lattice design)は、均衡不完全ブロック配置の改良型で、ブロック内の個体数がクローン数の二乗となっている点が特徴的である。

我が国の精英樹採種園でよく用いられ、使用するクローン数に応じて9型、25型、49型と呼ばれている（古越・谷口, 1982; 大庭, 勝田, 1991）。井出（1984）は、これら3つの型のブロック内の配置を自動的に行うコンピュータプログラムを開発し、手作業の煩雑さを解消すると同時に、隣接するクローンの組合せ頻度を均等化できるようにした。このプログラムでは、間伐を行い最終密度に誘導する場合、あるいは採種園の園地が不定形な場合や除地がある場合にも対応できるようになっている。Giertych(1965)は、規則的な配置法を考案し、クローン数が9～65クローンの場合について設定後と間伐後の同一クローンのラメート間の距離を算出している。この配置法は、我が国の一部の採種園で用いられている。これらのクローン配置法にはそれぞれ長所と短所があり、目的に応じて使い分ける必要がある。Giertych(1975)は、これらの方法について、自殖の排除、任意交配の起こり易さ、規則的な間伐のし易さ、補植のし易さ、デザインコストなどの得失を考察している。

3) 外部からの花粉汚染を防止し、遺伝的に優れた種子を生産する

花粉汚染の防止：針葉樹の花粉は風によって長距離に散布されるため、採種園における花粉汚染は最も重大な問題となっている（Di-Giovanni and Kevan, 1991）。針葉樹の花粉飛散距離については、多くの樹種について調べられている（Wright, 1976）。Strand（1957）は、樹高10mのNorway spruce(*Picea abies*)孤立木の周囲に花粉トラップを設置し、孤立木からわずか12.5mの地点までに、調査地点全体で確認された花粉量の97.0%の花粉が落下するとした。Wangら（1960）は、樹高11mのSlash pine(*Pinus elliottii* var. *elliottii*)孤立木の周囲に花粉トラップを設置し、大部分の花粉が30m以下に落下し、91mまでに全体の96.2%の花粉が落下するとした。また、Wangら（1960）は、同樹種の自然集団からの花粉飛散量は孤立木に比べて多く、320m地点でも全体の7%の花粉量が飛散することを示した。Silen(1962)は、樹高23.8mのDouglas-fir孤立木の周囲610mの地点までに花粉トラップを設置し、その花粉量は母樹から15m地点でピークに達し91m地点までは急激に減少するが、610m地点でも相当量の花粉が飛散することを明らかにした。古越（1978）は、樹高3mの黄金スギを花粉源として、その周囲に同心円状に250個体を密植した試験地でスギ花粉の有効花粉距離を測定し、半径10m以内に花粉が飛散していたとした。このように、樹種、樹高、風向きなどによって状況は異なるが、多くの針葉樹では花粉の大部分が100m以内に落下することが確認され（Wright, 1976）、多くの採種園で周囲からの花粉汚染を防ぐために122～152mの花粉隔離帯を設定している（Zobel and Talbert, 1984）。

また、花粉汚染を減少させる技術として、散水により採種園の開花時期を周囲の天然林の開花時期から遅らせるクーリング処理(Cooling treatment)がある。El-Kassaby ら (1990) は、Douglas-fir の採種園の一部の個体にクーリングをすることにより、その開花期が無処理の個体に比べて 9 日間遅れることを確認した。Fashler and El-Kassaby (1987)は、Douglas-fir の採種園にクーリングを行うと同時に、花粉トラップを用いて周囲からの花粉飛散状況を調査し、採種園内の雌花の受粉期が周囲の天然林からの花粉飛散期よりも 11 日間遅れることを示した。El-Kassaby and Ritland (1986a)は、クーリングが実施されている Douglas-fir の採種園の花粉汚染率が 0.2 %程度と非常に低い値であったとしている。

海外では、雌花に袋掛けを行わずに、予め集めておいた花粉を補完的に人工交配させる SMP (Supplemental Mass Pollination)処理も導入されている(Daniels, 1978; Askew, 1992; Sweet *et al.*, 1992)。この SMP 処理によっても花粉汚染を減少させる効果が認められている(Denison and Franklin, 1975)。El-Kassaby and Ritland (1986b)は、Douglas-fir の採種園において SMP 処理を行い、未処理の場合には 20 %前後の花粉汚染が認められたのに対し、SMP 処理によって花粉汚染がほとんど認められなくなったとした。

さらに、対象樹種の採種園を本来その樹種が自生していない場所に移動させることによって周囲からの花粉汚染を防ぐ方法も提唱されている (Koski, 1987; Denison and Franklin, 1975)。この場合の花粉汚染防止効果は明らかであり、むしろ開花期の異常、生育障害、気象害などが発生しないかが問題である。

4. 採種園における管理上の問題点

これまで、採種園の管理に関する研究について述べてきたが、解決すべき課題も残されている。ここでは、管理上の問題点の中で、特に、採種園構成個体と採種園産種苗の遺伝組成に関する管理の現状と問題点を述べる。

1) 採種園個体の遺伝組成 (クローン) の管理

採種園を造成するには、接ぎ木増殖、床替え、ラベル付け、運搬、定植などの多くのステップが存在する (Zobel *et al.*, 1958)。これらの採種園を造成する過程で、ラベルミスや植栽ミスといった人為的ミスが発生することがあり、林木育種推進上、世界的に大きな問題となっている (Wheeler and Jech, 1992)。このような人為的ミスが生じた場合、管理者の意図とは異なるクローン配置となり、期待している任意交配が起こらない可能性がある。

このような人為的ミスは想像以上に頻繁に発生し、その経済的損失は甚大であるとされている (Keil and Griffin, 1994)。また、クローン採種園では接ぎ木苗を用いることが多いが、接ぎ木後の保育管理や台木の不定芽の除去(中平・染郷, 1973)を怠ると、しばしば台木が立ち上がることが知られている(百瀬, 1969)。我が国で用いる台木の多くは、遺伝的改良が行われていない一般実生苗である。したがって、もし、立ち上がった台木が気付かれずにそのまま採種園の構成個体となった場合、花粉汚染源が採種園内部に存在することになり、採種園産種子の深刻な品質低下を引き起こすことが予想される。

このようなミスを検出するには、採種園を構成するクローンを互いに識別できる技術が必要である。従来、このようなクローンの識別には、針葉、冬芽、幹、球果、種子などの形態的な特徴が用いられてきた(石崎, 1965; 樋口, 1967; 宮島, 1989)。しかし、これら形態的な特徴は、しばしば環境による影響を受け、また明確な基準に乏しいことからクローンの識別基準としては問題がある。形態的特徴に代わる指標として、1970 年代に開発されたアイソザイムマーカー(Isozyme markers)は、クローンの識別に有効に用いられてきた (Feret and Bergmann, 1976; Adams, 1983; Bailey, 1983; Wheeler and Jech, 1992; Okuizumi, 1993)。しかし、アイソザイムマーカーは植物の生育段階や季節などの影響を受けることがある (Falkenhagen, 1985)。また、アイソザイムマーカーでは用いる酵素種が限定されるため、識別能力に限界があるとされている。Okuizumi(1993)は、九州産スギ挿し木品種 57 品種 323 個体を材料にして、9 酵素種 12 遺伝子座についてアイソザイム分析を行った。その結果、全部で 65 の遺伝子型が検出されたが、このうち 24 遺伝子型には複数の品種が内在した。これらの品種の中には明らかに由来の異なるものもあり、異なるクローンが同じ遺伝子型に分類されていると考えられる。したがって、アイソザイムマーカーでは、クローン数の多い採種園において完全な識別は困難であると予測される。

近年、DNA 分析技術の急速な進歩により、遺伝子の本体である DNA を指標とした分子マーカーがこのようなクローン識別に有効に用いられるようになってきた。特に、任意の短い塩基配列を持つプライマーを用いて PCR(Polymerase Chain Reaction)増幅を行う RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)マーカー (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990)は、多型性が高く樹種内の変異を容易に捉えることができる。さらに、RAPD マーカーは非常に簡便で、微量のサンプルを用いて分析を行うことができる (Hedrick, 1992; Waugh and Powell, 1992)。そして、RAPD マーカーがアイソザイムマーカーと最も異なるところは、理論的には無限にマーカー数を増やすことができる点である

(Roy *et al.*, 1992)。Van de Ven and McNicol(1995)は、アイソザイムマーカーで識別できなかった Sitka spruce(*Picea sitchensis*)の精英樹 57 クローンが、6 個の RAPD マーカーで互いに識別できたとした。家入・宮島 (2000) は、アイソザイムマーカーで同一遺伝子型として分類されたヒノキサシ木品種 47 個体を RAPD 分析し、それらがさらに 5 つのグループに分類されたとしている。したがって、RAPD マーカーは、クローン数の多い採種園においても正確に識別する基準となりうることを期待される。ただし、RAPD マーカーは、対象とする樹種やクローンによって多型性が異なるため、対象とする採種園構成クローンを完全に識別できるだけの十分な変異が得られるかどうかは問題である。また、採種園クローン以外の不正規な個体が混入した場合、それを検出できるかどうかを検討する必要がある。

RAPD 分析では、プライマー、鋳型 DNA、MgCl₂ などの濃度、アニーリング温度、使用する PCR 装置、ポリメラーゼの種類などが増幅物の電気泳動像に影響を与えることが知られており (Schierwater and Ender, 1993)、その再現性に関して様々な議論が行われてきた (Penner *et al.*, 1993)。これらを最適化した条件下でも、同じ DNA を鋳型として複数回の PCR 反応を行った場合の再現性は、マーカーによって異なることが知られている (Skroch and Nienhuis, 1995)。したがって、RAPD マーカーを採種園クローンの識別に用いるためには、再現性の高いフラグメントだけを識別の基準として用いる必要がある。

採種園は非常に多くの個体で構成されているため、全ての個体から個別に DNA を抽出し、RAPD 分析を行うには莫大な時間、労力、コストが必要となる。特に、複雑な工程の多い DNA の抽出作業は時間がかかるため、現実的に処理できるサンプル量には限界がある。したがって、採種園構成個体のクローン識別を実際に行うためには、クローン識別の簡便化法の開発も大きな課題であり、特に DNA 抽出作業の省力化を図る必要がある。

2) 採種園産種苗の遺伝組成の管理

採種園が造林種苗の供給に対して重要な役割を果たすようになるとともに、採種園産種苗の遺伝組成や遺伝的品質はますます重要な問題となっている (Szmidi, 1987)。採種園産種苗の遺伝組成を適正に管理するためには、まず採種園における交配実態を明らかにする必要がある。自然交配を利用した採種園では、花粉汚染や自殖がほとんどなく、採種園を構成するクローンが採種園産種苗に対して均等に寄与していることが理想であり (Eriksson *et al.*, 1973; El-Kassaby *et al.*, 1984; Wheeler and Jech, 1992)、これらの条件をで

きるだけ満たすための措置を講ずる必要がある。

採種園における外部の未選抜集団からの花粉汚染に対しては、前述した隔離帯を設けるなどの措置が取られている。しかし、条件によっては、この隔離帯を越えて外来花粉が飛散してくることもある (Denison and Franklin, 1975)。Squillace(1967)は、周囲 122m に花粉隔離帯を設定した Scots pine 採種園内の全ての雄花を除去したにもかかわらず、雄花を除去しない場合と同様に 1 球果当たり約 50 粒の充実種子が採種でき、それらは発芽可能であったとした。そして、Squillace(1967)は、Scots pine では、採種園内の雄花着生量が少ない場合、122m の花粉隔離帯では花粉汚染の防止は困難であると考察している。

近年、アイソザイム分析などにより、採種園における花粉汚染の実態解明が行われるようになってきている (Di-Giovanni and Kevan, 1991; Wheeler and Jech, 1992)。Douglas-fir では、クローン集植所において 2 年間で 44 ~ 89 % (Fast *et al.*, 1986)、採種園の 1 ブロックにおいて 5 年間の平均で 48.9 % (Adams *et al.*, 1997) という高い花粉汚染率が認められている。Scots pine の採種園では、38 % (Nagasaka and Szmidt, 1985)、21 と 36 % (El-Kassaby *et al.*, 1989)、26 と 33 % (Harju and Muona, 1989)、30 % (Wang *et al.*, 1991) とやはり高い花粉汚染率が報告されている。Loblolly pine の採種園でも、36 % の花粉汚染率が報告されている (Friedman and Adams, 1985)。このように、調査された多くの採種園では、花粉汚染率が 20 % を超える深刻なレベルに達しており、採種園における花粉汚染の実態解明とその防止は依然として重要な課題である。

また、多くの針葉樹では、自殖 (Selfing) が生じると近交弱勢 (Inbreeding depression) が発生し、球果数や充実種子数が減少するとともに、種子の発芽率も低くなることが知られている (Hadders and Koski, 1975)。また、自殖苗は、苗畑の早期段階での枯死率が高く、その後の成長も悪いことが多い (Wright, 1976)。したがって、採種園産実生苗における自殖苗の割合が高くなると、採種園産種苗の遺伝的品質が低下する危険性がある (古越, 1979)。クローン採種園では、同一クローンのラメート (Ramet) 複数個体が一定範囲内に存在するため、自殖が生じる危険性が高いと考えられてきた (Fast *et al.*, 1986; Barrett *et al.*, 1987)。そこで、アイソザイムマーカーを用いて、採種園産種子における自殖率 (Selfing rate) が調査された。これまで報告された採種園における自殖率の多くは 5 % 程度であり

(Rudin and Lindgren, 1977; Adams and Joly, 1980; Shen *et al.*, 1981; Shaw and Allard, 1982; Ritland and El-Kassaby, 1985; Rudin *et al.*, 1986)、天然林と変わらないレベルであった (Hadders and Koski, 1975)。しかし、採種園によっては、10 % 以上の高い自殖率が認めら

れることもあり (Moran *et al.*, 1980; Müller-Starck, 1982)、採種園種子における自殖の実態解明とその防止も重要な課題である。

これまで、採種園産種苗に対する各クローンの花粉親としての寄与を評価するために、各クローンの花数数が用いられてきた (Eriksson *et al.*, 1973; Griffin, 1982; 勝田, 1982; O'reilly *et al.*, 1982; Schoen *et al.*, 1986)。しかし、採種園の交配様式は、クローン間の距離、クローンごとの花粉量、開花期の一致性、開花時期の主風方向などによって影響を受けることが知られている。Douglas-fir 採種園において、アイソザイムマーカを用いて花粉の飛散距離を調査した結果、そのほとんどが 30m 以内に散布されることが報告された (Erickson and Adams, 1989; Prat, 1995)。また、Shen ら (1981) は、Scots pine 採種園の交配様式を調査し、隣接個体の花粉による受粉率が 31 % 以上となったとした。Schoen and Stewart (1986) は、White spruce 採種園における各クローンの花数と交配寄与率を調査し、一定レベルまでは花数が多いほど交配寄与率が高くなるとした。Erickson and Adams (1989) は、Douglas-fir 採種園において各クローンの開花期とクローン間の交配寄与率を調査し、開花期の一致性が交配様式に影響を与えることを示した。最近では、異なるクローンの花粉を混合して交配した場合に、特定のクローンの花交配成功率が高くなる選択受精 (Differential Male Reproductive Success; DRS) 現象も認められている (Moran and Griffin, 1985; Apsit *et al.*, 1989; Nakamura and Wheeler, 1992)。

したがって、採種園において任意交配が行われ、各クローンが花粉親として採種園産種苗に対して均等に寄与しているかどうかを明らかにするためには、遺伝マーカーによって採種園産種苗の花粉親を識別する必要がある。Schoen and Stewart (1986) は、White spruce 採種園を構成する 7 家系の種子について、アイソザイムマーカを用いてその花粉親の一部を識別することに成功した。しかし、アイソザイムマーカでは、多数の採種園構成クローンの中から各種子の花粉親を識別することは困難であると考えられており (Rudin and Lindgren, 1977)、この報告を除いて、採種園産種苗に対する各クローンの花粉親としての寄与の程度はほとんど明らかとなっていない。

近年、DNA 分析技術は急速な発展を遂げ、DNA 分子マーカーを用いた交配様式の解明が可能となりつつある。特に、葉緑体 DNA は多くの針葉樹で父性遺伝することが確認されている (Neale and Sederoff, 1989; Wagner, 1992)。したがって、採種園構成クローン内に葉緑体 DNA の変異が検出できれば、その変異を利用した花粉親分析が可能となる。宮原ら (1998) は、葉緑体 DNA の *rbcL* 遺伝子上の変異を利用して、マツノザイセンチュウ抵

抗性クロマツ採種園における交配様式の一部を明らかにした。構成クローンの中には、特異的な変異を有する小浜ーク 24 号が存在する。そこで、宮原ら（1998）は、採種園産種子に対する小浜ーク 24 号の交配寄与率を調査し、その寄与率が任意交配を仮定した場合の半分以下であったとした。清藤ら（2000a）は、葉緑体 DNA のスペーサー領域の変異を検出し、ヒノキ精英樹採種園の交配様式の一部を明らかにした。山梨県の採種園を構成するクローンの中には、特異的な変異を有する鰯沢 5 号が存在する。そこで、清藤ら（2000a）は、この鰯沢 5 号の採種園産種子に対する交配寄与率を調査し、豊作年では任意交配を仮定した場合に近い値を示すが、凶作および並作年ではそれを大きく下回ることを示した。しかし、これらの方法では、採種園産種苗に対する特定クローンの寄与は評価できるが、全ての構成クローンの寄与の程度を知ることはできない。

葉緑体 DNA 内に存在する一塩基の繰り返し配列である cp-SSR(chloroplast-Simple Sequence Repeat)マーカーは、非常に多型性に富み、多くの樹種で種内変異が報告されている(Powell *et al.*, 1995; Cato and Richardson, 1996; Echt, 1998; Stoehr *et al.*, 1998; Vendramin *et al.*, 1998)。このような種内変異は、花粉親分析にも有効に用いられている(Powell *et al.*, 1995; Ziegenhagen *et al.*, 1998)。Stoehr ら（1998）は、Douglas-fir で発見された非常に多型的な cp-SSR マーカーが、調査した採種園を構成する 20 クローンで 13 個の変異型があった。そこで、Stoehr ら（1998）は、この変異を利用して、採種園を構成する 6 家系の種子を分析し、各家系について採種園構成クローンの花粉親としての交配寄与の程度を明らかにした。しかし、cp-SSR マーカーの開発には多くの時間やコストがかかる上に、分析にはシーケンサーなどの高額な分析機器が必要である。さらに、対象樹種に Douglas-fir と同様に非常に多型的なマーカーが見つかるという保証はない。したがって、比較的簡単な設備で実験が可能で、どの樹種にも応用可能な、新たなマーカーを用いた採種園種苗の花粉親識別法の開発が求められている。

5. マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園の歴史的経緯

クロマツは、我が国の海岸地域における代表的な植生であり、防風、防砂、防潮林としての役割を果たすとともに、「白砂青松」の伝統的な海岸美として古来から人々に親しまれてきた。しかし、1905 年頃から各地のマツ林に集団的な立枯れが現れはじめ、その後増減をくり返してきたが、1960 年代に入って再び被害が増大し、1979 年には材積で 243 万 m³の被害が記録された(戸田, 1997)。その被害は、我が国における最大の森林病害と

なり、欧米のニレ立枯病、クリ胴枯病、五葉松さび病とともに世界的な外来流行病害となっている（田畑，1997）。その後、被害量自体は1979年をピークに減少の傾向にあるが、現在でも全国で毎年100万m³のアカマツとクロマツが枯損している（林野庁森林保護対策室，1996）。被害形態もこれまでの林分上層の大径木・老齢木が主体であったものから、近年では若齢小径木にも及んでおり、材積だけでは論じがたい面もある（戸田・寺田，1997）。また、マツ枯れの被害は、当初は予想もつかなかった東北地方や寒冷地にも分布を拡大しており（小島・王鷲，1987；佐藤，1990）、依然として深刻な問題となっている。

こうしたマツの大量枯損は、当初はいわゆる「松くい虫」とよばれる甲虫類の食害によると考えられてきたが、清原・徳重（1971）によってマツノザイセンチュウ（*Bursaphelenchus xylophilus*）による伝染病であることが明らかにされた。その後、マツノザイセンチュウは、マツノマダラカミキリ（*Monochamus alternatus*）によって運ばれ、マツノマダラカミキリの後食痕からマツ樹体内に侵入するという被害サイクルが、森本・岩崎（1972）などによって明らかにされた。これらの研究成果を受けて、マツノマダラカミキリ防除のための薬剤散布を行うとともに、マツノザイセンチュウ抵抗性育種の重要性和可能性が議論され、マツノザイセンチュウの人工接種検定法、大量培養法などが次々と開発、実用化された（大庭，1979；戸田，1997）。

現在のマツノザイセンチュウ抵抗性育種を考える上で、最も重要な事業は1978年～1984年にかけて和歌山県以西の西日本14県と九州（林木育種センター九州育種場）、関西（同関西育種場）、四国（同関西育種場四国事業場）の国立3機関を加えた合計17機関で国家プロジェクトとして実施された「西日本におけるマツノザイセンチュウ抵抗性育種事業」である。このプロジェクトでは、激害林分に生存していた抵抗性候補木から接ぎ木苗を養成して、剥皮接種法（戸田，1997）によってマツノザイセンチュウを苗木1本あたり約1万頭を接種する第一次検定を行った。合格クローンには、抵抗性の強いLoblolly pineと比較することによる第二次の接種検定が行われた。これらの検定の結果、アカマツでは11,466個体の候補木から92個体、クロマツでは14,620個体の候補木から16個体（Table-1.1-1）の抵抗性クローンが選抜された（藤本ら，1989）。その後、これらの抵抗性クローンの接ぎ木苗を用いたクローン採種園が造成され、1997年までにアカマツ16ヶ所9.16ha、クロマツ21ヶ所9.09haの採種園が整備されている（林木育種センター，1999）。近年、西日本地域の採種園からは、事業的な規模で種子生産が行われるようになってきており（鳥羽瀬ら，1993；戸田ら，1993；宮原，1997）、本格的な抵抗性種苗の生産体制が整備

**Table 1.1-1 Description of the resistant clones consisting of
Japanese black pine seed orchards**

Clone	Location of ortets
Namikata-(t)73 (波方-ク73号)	Namikata town, Ochi dist., Ehime pref.
Obama-(t)30 (小浜-ク30号)	Obama-town, Minamitakagi dist., Nagasaki pref.
Tosashimizu-(t)63 (土佐清水-ク63号)	Tosashimizu city, Kouchi pref.
Oita-(t)8 (大分-ク8号)	Oita city, Oita pref.
Ei-(t)425 (穎娃-ク425号)	Ei town, Ibusuki dist., Kagoshima pref.
Tsuyazaki-(t)50 (津屋崎-ク50号)	Tsuyazaki town, Munakata dist., Fukuoka pref.
Misaki-(t)90 (三崎-ク90号)	Misaki town, Nishiuwa dist., Ehime pref.
Ooseto-(t)12 (大瀬戸-ク12号)	Ooseto town, Nishisonogi dist., Nagasaki pref.
Namikata-(t)37 (波方-ク37号)	Namikata town, Ochi dist., Ehime pref.
Tanabe-(t)54 (田辺-ク54号)	Tanabe city, Wakayama pref.
Yasu-(t)37 (夜須-ク37号)	Yasu town, Kami dist., Kouchi pref.
Shima-(t)64 (志摩-ク64号)	Shima town, Itoshima dist., Fukuoka pref..
Yoshida-(t)2 (吉田-ク2号)	Yoshida town, Kitauwa dist., Ehime pref.
Sendai-(t)290 (川内-ク290号)	Sendai city, Kagoshima pref.
Mitoyo-(t)103 (三豊-ク103号)	Yamamoto town, Mitoyo dist., Kagawa pref.
Obama-(t)24 (小浜-ク24号)	Obama town, Minamitagagi dist., Nagasaki pref.

されつつある。

6. マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園における課題

クローン採種園では、不良クローンを除去した後も、遺伝的な多様性が保持できるように、25～40 クローンで最初の採種園が構成されることが多い (Zobel and Talbert, 1984)。しかし、クロマツはアカマツに比べて抵抗性クローンの選抜効率が悪く、最終的に選抜できたのはわずかに 16 クローンであった (藤本ら, 1989)。したがって、優れた抵抗性種苗を生産するため、また、少しでも遺伝的に多様な種苗を生産するためには、多くの構成クローンが使用できる精英樹採種園におけるよりも精緻な管理技術が必要である。採種園を構成するこれらのクローンは、マツノザイセンチュウ抵抗性を基準に選抜されたため、着花性や種子生産性などは選抜時には不明であった。そこで、マツノザイセンチュウ抵抗性以外の形質である、構成クローンの着花性、種子生産性、開花期などに関する様々な調査が行われた (戸田ら, 1993; 戸田ら, 1994a; 戸田ら, 1994b)。しかし、採種園産種子における各クローン種子の構成割合については、鹿児島県採種園の例 (川内, 2000)を除き、成熟期の採種園における具体的な数値はほとんど報告されていない。また、採種園では自然交配による種子生産が行われているため、採種園産種苗に対する構成クローンの花粉親としての寄与は不明である。したがって、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園では、採種園産種苗に対する構成クローンの母親と花粉親としての寄与の程度を明らかにし、各構成クローンが母親および花粉親として均等に寄与できるように管理する必要がある。

現在、林木育種センター九州育種場では、クロマツの新たなマツノザイセンチュウ抵抗性クローンを選抜中であり (戸田ら, 1998; 1999)、近い将来、新たな抵抗性クローンが確定する見込みである。現在のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園の構成クローンは 16 と非常に少ないため、これ以上クローン数を少なくすることは望ましくないが、新たな抵抗性クローンが確定した後の将来的な遺伝的改良の方向性についても検討しておく必要がある。採種園産種苗のマツノザイセンチュウ抵抗性については、選抜当初から数多くの研究がなされてきた (戸田ら, 1992; 戸田ら, 1993; 中野, 1995; 戸田ら, 1997b; 後藤・宮原, 2000; 川内, 2000)。最近では、九州地方の各研究機関におけるマツノザイセンチュウ接種結果から各クローンの家系抵抗性について評価を行った抵抗性マツ特性表 (九州地区林業試験研究機関連絡協議会・育種部会, 1999) も完成し、多くの情報が得られるようになってきた。これらの抵抗性は、全て構成クローンの自然交配実生苗に対するマツノ

ザイセンチュウ接種試験の結果から評価されている。つまり、各クローンが母親として寄与した実生苗の抵抗性であるといえる。

アカマツはクロマツに比べて樹種としての抵抗性が高いことが知られている（藤本ら, 1989; 岸, 1995）。クロマツ×アカマツの人工交雑家系では、ほとんどの場合、クロマツの自然交雑家系よりもマツノザイセンチュウ抵抗性が向上することが知られている（戸田ら, 1990; 戸田ら, 1997a）。また、同様に抵抗性が強いタイワンアカマツ（*Pinus massoniana*）との人工交雑種（クロマツ×タイワンアカマツ）でも、抵抗性向上の事例が報告されている（石井ら, 1983; 栗延・藤沢, 1988; 戸田, 1997）。したがって、採種園種苗のマツノザイセンチュウ抵抗性は、その母親だけではなく、花粉親の影響も受けることは明らかである。各クローンの花粉親としての次世代抵抗性への寄与の程度を明らかにするためには、人工交配に対するマツノザイセンチュウ接種試験を行う必要がある。しかし、各地に造成されたマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園では、その一部がようやく成熟期に入ったところであり、大規模な人工交配は行われていない。したがって、採種園構成クローンの花粉親として採種園種苗のマツノザイセンチュウ抵抗性に与える影響についてはほとんど報告がなく、緊急に明らかにすべき課題である。

7. 本論文の構成

これまで述べてきたように、採種園においてはその構成個体と採種園産種苗の遺伝組成を管理することが緊急かつ重要な課題である。そして、それらの遺伝組成の実態を解明し、適正に管理を行うためには、有効な遺伝マーカーの開発が必要とされている。本研究では、DNA 分子マーカーの一つである RAPD マーカーを主に用いて、採種園構成個体と採種園産種苗の遺伝組成を明らかにし、それを人為的にコントロールすることを「採種園の遺伝子管理（Gene management）」と定義した。そして、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園における遺伝子管理に資する研究を行った。

本章に続く第2章では、遺伝子管理を行うために有効なマーカーの探索とそれらを用いた遺伝子管理技術、すなわちクローン識別法と採種園産種苗の花粉親識別法の開発を行った。

第3章では、第2章で開発した遺伝子管理技術を実際の採種園に適用し、採種園におけるクローン管理と交配の実態を解明した。

第4章では、採種園構成クローンが採種園産種苗に対して、また、そのマツノザイセン

チュウ抵抗性に対して、母親または花粉親としてどの程度寄与しているかを評価した。

第5章では、本研究で得られた知見をもとに、採種園の遺伝子管理に関する総合的な考察を行い、研究対象としたマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園の遺伝子管理についての具体的な提案を行った。

第2章 RAPD マーカーを利用した採種園の遺伝子管理技術の開発

第1節 序

第1章で提唱した採種園の遺伝子管理を行うためには、有用な遺伝マーカーの探索とそのマーカーを利用した遺伝子管理技術、すなわちクローン識別法および採種園産種苗の花粉親識別法の開発が必要である。RAPD マーカーは、任意の塩基配列を持つプライマーを用いて PCR 増幅することによって、樹種間および樹種内の多型を検出することができる (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990)。しかし、対象樹種、あるいは対象クローンによって利用可能なプライマーやフラグメントが異なるため、研究対象とするマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成するクローン間で有効なマーカーを探索する必要がある。また、RAPD マーカーの再現性は議論の対象になっており (Penner *et al.*, 1993)、信頼性の高い識別法の確立が求められている。採種園は非常に多くの個体によって構成されているため、全ての個体から個別に DNA 抽出および RAPD 分析を行うには、莫大な時間、労力、コストがかかる。したがって、採種園構成個体の遺伝子管理の実用化に際しては、クローン識別の簡便化法の開発も検討する必要がある。また、これまで、採種園産種苗の花粉親の識別にはアイソザイムマーカーが用いられてきた (Wheeler and Jech, 1992)。しかし、用いる酵素種に限りがあるため、多数の採種園構成クローンの中からその花粉親を識別するのは容易ではなく (Rudin and Lindgren, 1977)、新たなマーカーを用いた採種園産種苗の花粉親識別法の開発が求められている。

第2節では、採種園構成クローンの識別を行うために、多型的でしかも再現性が高い RAPD マーカーを探索取得した。そして、取得したマーカーの表現型によって、採種園構成クローンが互いに識別できるかどうか検討した。

第3節では、クローン識別の簡便化法として、複数個体の針葉を混合して一度に DNA 抽出と RAPD 分析を行うバルク法の開発を試みた。本章では、2つのクローンを異なる割合で混合したサンプルを用いて RAPD 分析を行い、各マーカーの保有するクローン識別能力を検討した。

第4節では、RAPD マーカーを用いた採種園産種苗の花粉親識別法の開発を行った。本節では、採種園構成クローンの針葉と雌性配偶体を用いて、花粉親識別に有効なマーカーの探索と、探索したマーカーにおける各クローンの遺伝子型の決定を行った。さらに、人工交配苗を用いて、決定した遺伝子型の正確性を検証した。

第2節 RAPD マーカーの表現型によるクローン識別法の開発

2. 2. 1 はじめに

我が国のマツ林に深刻な被害をもたらしたマツノザイセンチュウ病 (Pine-wilt disease) に対する育種的な防除対策の一つとして、本病に抵抗性を有するアカマツ (*Pinus densiflora*) とクロマツ (*Pinus thunbergii*) の個体選抜が行われ、アカマツ 92 個体、クロマツ 16 個体が抵抗性クローンとして選抜された (藤本ら, 1989)。その後、これらの接ぎ木苗を用いたクローン採種園が各地に造成され、今日これらの採種園からは抵抗性種苗が生産されるに至っている (戸田ら, 1993; 鳥羽瀬ら, 1993; 宮原, 1997)。九州地方では、マツノザイセンチュウ病によって壊滅的な被害を受けた海岸林を再生し、防潮林あるいは防砂林として利用するため、また白砂青松の海岸美を取り戻すため、クロマツの抵抗性種苗が望まれている。

抵抗性の高い優良な種苗を生産するためには、採種園における適正なクローン配置が不可欠である。しかし、採種園の造成や管理に伴うラベルミスや植栽ミスなどの人為的ミスの発生は、林木育種推進上、世界的に大きな問題となっている (Wheeler and Jech, 1992)。このようなミスを早期に検出し、経済的な損失を最小限に抑えるためには、採種園を構成するクローンを互いに識別できる技術が不可欠である。クローン識別のための指標には、クローン間で十分な変異があり、クローン内で生育段階や環境の違いによる変異がないという条件が求められる (Bailey, 1983)。マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成する 16 クローンのうち、長崎県から選抜された小浜ーク 24 号は抵抗性クロマツとして選抜されたが、その後の樹脂道指数 (戸田ら, 1994b) および開花フェノロジー (戸田ら, 1994a) の調査結果、葉緑体および核 DNA 分析 (渡辺ら, 1996) などから、クロマツとアカマツの雑種であることが判明している。このクローンは、幹、針葉、冬芽などの形態がアカマツとよく似た特徴を示し、容易に他のクローンと識別することができる。また、福岡県から選抜された志摩ーク 64 号は枝が分岐しやすい特異な性質を有することから、「荒雄」として品種登録されており、このクローンも視覚的に他と区別することができる。しかし、これら以外のクローンを形態的特徴によって正確に識別することは困難である。

アイソザイムマーカー (Isozyme markers) は、形態的特徴に代わる指標として、クローンの識別に用いられてきた (Feret and Bergmann, 1976; Adams, 1983; Bailey, 1983; Wheeler and Jech, 1992)。クロマツのアイソザイム種内変異は、Shiraishi (1988) によって最初に報告さ

れ、その後、西村(1991)は、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園 16 クローンを材料として、5 酵素種 7 遺伝子座についてアイソザイム分析を行い、その一部が識別可能であるとした。しかし、アイソザイムマーカーは環境条件や生育段階の影響を受けることがあり (Falkenhagen, 1985)、また用いる酵素種の数に限界があることなどから、本採種園のクローン識別法としては実用的な段階には至っていない。

近年、DNA 分析技術の急速な進歩により、遺伝子の本体である DNA を指標とした分子マーカーがクローン識別法として有効に用いられるようになってきた。特に、任意の塩基配列を持つ 10 塩基程度の短いプライマーを用いて PCR(Polymerase Chain Reaction)増幅を行う RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)マーカー (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990)は、多型性が高く樹種内の変異を容易に捉えることができる。筆者は、これまで RAPD マーカーを用いて、接ぎ木あるいは挿し木によって栄養繁殖されたハゼノキ (*Rhus succedanea*) およびスギ(*Cryptomeria japonica*)の品種識別を行ってきた(後藤ら, 1997; 1999)。これらの研究の結果、RAPD マーカーは、1) 同一樹種の品種間で十分な変異が得られること、2) 同一品種の樹齢や環境の異なる林分から採取した個体間で変異がないこと、すなわち Bailey(1983)が提唱したクローン識別の基準を満たしていることを明らかにした。そこで、本研究では、この RAPD マーカーをマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成する 16 クローンに適用し、これらのクローン識別法を開発することを試みた。

まず、採種園を構成する 16 クローンの間で多型的な RAPD マーカーを探索し、PCR 反応を繰り返すことによってその再現性を確認した。また、選抜されたマーカーの有無の組合せによる表現型が、各クローンに固有のものとなっているかどうかについて検討を行った。さらに、各クローンにおけるマーカーの出現頻度から、遺伝的に異なる個体が採種園構成クローンと偶然に同じ表現型を示す確率を算定し、採種園内に不正規に混入した個体を検出できるかどうかについて検討した。

2. 2. 2 材料と方法

供試材料

供試材料は、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成する 16 クローンで、Fig2.2-1 に示した福岡県小郡市のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園(以下、福岡県採種園とする)の南側最前列に植栽された各クローン 1 個体と、福岡県森林林業技術



Fig 2.2-1 Fukuoka prefectural Japanese black pine seed orchard, consisting of nematode-resistant clones located in Ogoori, Fukuoka, Japan.

センターにクローン集植された 16 クローン各 1 個体の合計 32 個体である。各個体からは当年枝の針葉を採取し、DNA 分析に供するまで -20°C のフリーザーで保存した。

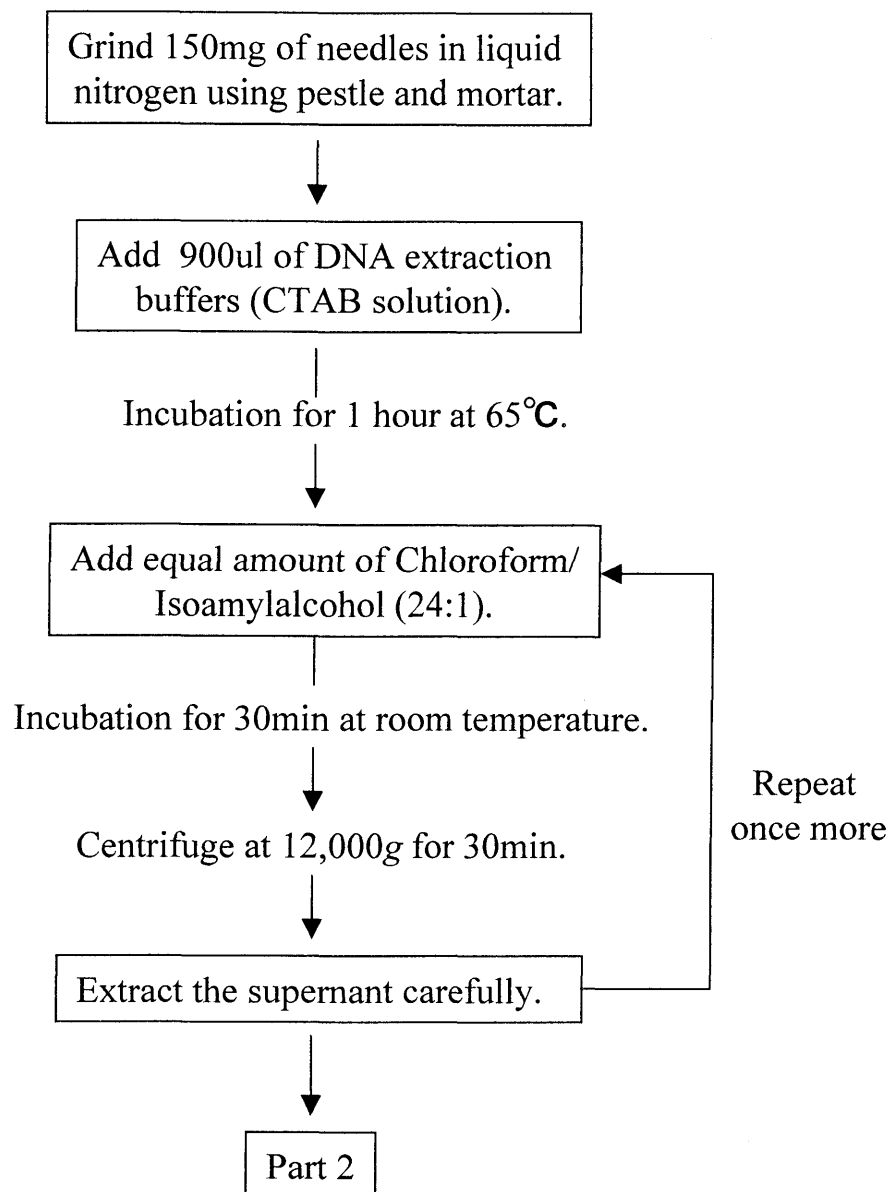
DNA 抽出と RAPD 分析

針葉からの全 DNA 抽出は、CTAB 法を改良した白石・渡辺（1995）の方法にほぼ従った。DNA 抽出の手順を Fig 2.2-2 に示す。針葉 150mg を乳鉢を用いて液体窒素中で摩砕した後、900ml の抽出緩衝液（100mM Tris-HCl, pH9.0, 2 %CTAB（hexadecyl trimethylammonium bromide）, 0.1% β -メルカプトエタノール, 1.4M NaCl, 20mM EDTA）を加え、 65°C で 1 時間インキュベートした。これに等量のクロロホルム／イソアミルアルコール混合液（24：1）を加えて 30 分間穏やかに混和した後、 $12,000 \times g$ （室温）で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。この溶液に再度等量のクロロホルム／イソアミルアルコール混合液を加え、上記操作を繰り返した。得られた溶液に 600ul のイソプロパノールを加えて 10 分間 4°C に整置した後、 $12,000 \times g$ （ 4°C ）で 10 分間遠心分離し、上清を除去した。その後、400ul の 70 %エタノールを加えてチューブ内を洗浄し、 $12,000 \times g$ （ 4°C ）で 5 分間遠心分離して DNA を集めた。上清を捨て、さらにマイクロピペットを用いて 70 %エタノールをできる限り除去した後、クリーンベンチ内で風乾し、得られた DNA ペレットに純水（100ul）を加えて 50°C で 30 分間溶解した。得られた DNA 溶液は、Elu-QuikTM DNA 精製キット（Schleicher & Schuell 社）を用いて精製し、PCR の鋳型 DNA として用いた。

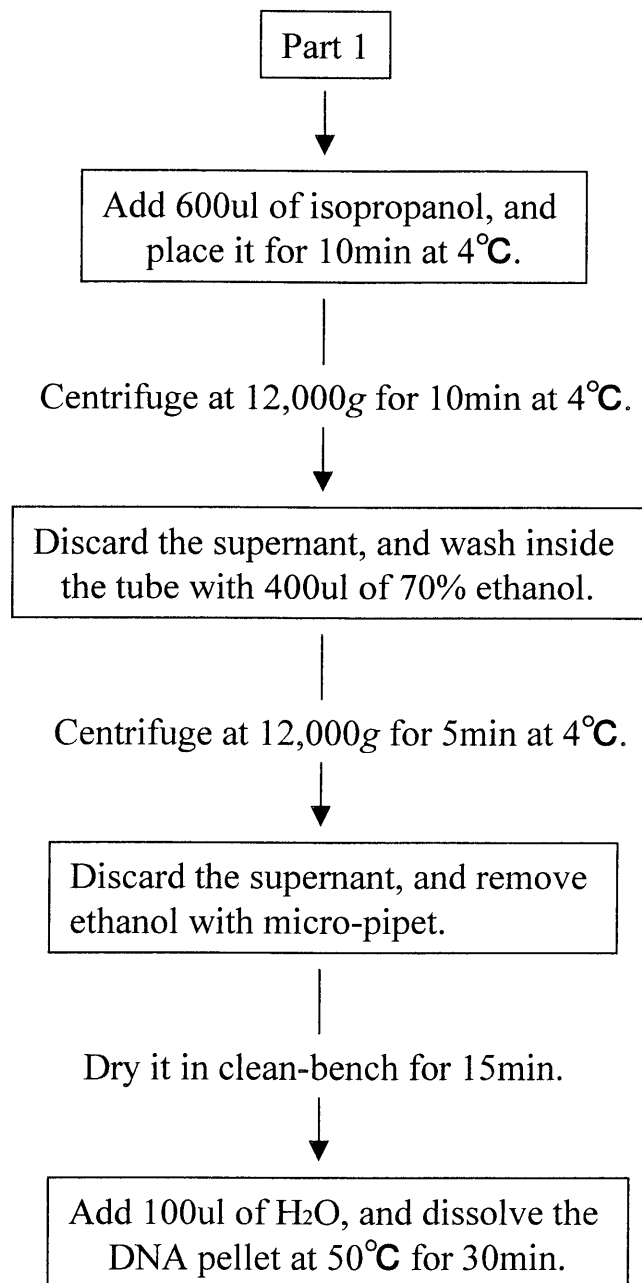
PCR 反応液（20 μl ）の組成は、10ng 鋳型 DNA、10 \times PCR Buffer（10mM Tris-HCl, pH 8.3, 10mM KCl）、0.20mM 各 dNTP、0.25 μM RAPD プライマー、3.0mM MgCl_2 、1 ユニット Taq DNA ポリメラーゼ（*AmpliTaq* Stoffel Fragment, Perkin-Elmer 社）である。サーマルサイクラーは TaKaRa PCR Thermal Cycler MP（TP3000）を使用し、まず 94°C で 1 分間変性処理を行った後、変性（ 94°C , 10 秒）・アニーリング（ 36°C , 30 秒）・伸長（ 72°C , 1 分）を 45 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 7 分間の伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、2.0 %アガロースゲルを用いて電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色を行い、UV トランスイルミネーター上で DNA 多型を検出した。

マーカーの探索

福岡県採種園に植栽された 5 クローン、波方ーク 73 号、小浜ーク 30 号、土佐清水ーク 63 号、大分ーク 8 号、顚娃ーク 425 号の各 1 個体を用いて、クローン識別に有効なプライマーの 1 次スクリーニングを行った。使用した RAPD プライマーは、オペロン社製の A, G,



**Fig 2.2-2 The procedure of DNA extraction from needles of Japanese black pine
-Part 1-.**



**Fig 2.2-2 The procedure of DNA extraction from needles of Japanese black pine
-Part 2-.**

P, S, T, U シリーズの 120 種類と、白石ら (1996) により報告されている FB-01 ~ 06 の 6 種類の合計 126 種類である。ここで、本研究で用いるフラグメントとマーカーという 2 つの用語について整理する。本研究では、「フラグメント」とは PCR 産物を電気泳動によって分画した個々の断片とし、「マーカー」とは得られたフラグメントのうち、再現性があり、かつクローンの識別に利用可能な有無が認められるものとした。マーカーの 1 次スクリーニングでは、5 クローンの RAPD 分析を行った際に、得られた PCR 産物の電気泳動像が多型的で明瞭なプライマーを選抜した。2 次スクリーニングでは、1 次スクリーニングで選抜したプライマーについて、福岡県採種園の 16 クローン各 1 個体を用いて、クローンごとに有無が明瞭に区別できるフラグメントで、付近に紛らわしい他のフラグメントがないものをマーカーの候補として選抜した。マーカーの候補として選抜したフラグメントの再現性を検討するために、1 次スクリーニングに用いた 5 クローンの DNA を再度用いて 5 回の PCR 反応を行った。5 回の反応で、一度でも増幅が不十分であった場合や、マーカーの候補としたフラグメント付近に紛らわしい他のフラグメントが認められた場合は、識別に不適当であるとして除外した。そして、この再現性テストに合格したフラグメントをマーカーとし、プライマー名とフラグメントサイズ (bp; base pair) で標記した。

マーカーの再現性の検討

取得したマーカーの再現性を検討するために、同一クローンで異なる生育環境に植栽された 2 個体の表現型を比較した。なお、本研究でいう「表現型」とは、各個体における単一のマーカーの有無、もしくは複数のマーカーの有無の組合せ、のことである。福岡県森林林業技術センターに集植された 16 クローン各 1 個体を分析し、福岡県採種園に植栽された個体と表現型が一致するかどうか検討した。また、福岡県森林林業技術センターと森林総合研究所の 2 つの研究機関において、福岡県採種園の 16 クローン各 1 個体から抽出した DNA を共通に用いて RAPD 分析を行い、各研究機関における表現型が一致するかどうか検討した。

不正規個体の検出能力

RAPD マーカーを用いた識別法では、採種園構成クローン以外の遺伝的に異なる個体の表現型が採種園を構成するクローンと偶然に一致する確率は、各クローンにおけるマーカーの出現頻度を掛け合わせることによって算定できる (後藤ら, 1997)。単純化のために、採種園構成クローンが A, B, C の 3 クローンのみであったと仮定して、この確率の算定方法を述べる。4 個のマーカーを用いた場合、例えばマーカー # 1 が A、# 2 が A と B、

#3がBとC、#4がAに出現したとする。まず、クローンAと遺伝的に異なる個体の表現型が偶然に一致する確率を算定する。マーカー#1はクローンAのみに出現したので、偶然にAと同じ表現型となる確率は1/3である。マーカー#2はAとBに出現したので、この確率は2/3となる。マーカー#3はBとCに出現したので、この確率は1/3である。マーカー#4はAのみに出現したので、この確率は1/3である。したがって、これから4個のマーカー全てにおける表現型が偶然にAと一致する確率は、 $1/3 \times 2/3 \times 1/3 \times 1/3 = 0.025$ （約40分の1）となる。つまり、計算上では、遺伝的に異なる40個体のうち1個体は、その表現型がAと一致することになる。同様に、BとCにおける確率を求めると、Bでは $2/3 \times 2/3 \times 2/3 \times 2/3 = 0.200$ （約5分の1）となり、Cでは $2/3 \times 1/3 \times 2/3 \times 2/3 = 0.099$ （約10分の1）となる。つまり、より出現頻度の低いマーカーを保有するクローンほど、偶然に一致する確率は低くなる。本研究では、取得したマーカーの全てを用いた場合に、遺伝的に異なる個体の表現型が偶然に採種園構成クローンと一致する確率を算定し、不正規な個体が採種園に混入した場合の検出能力を検討した。

2. 2. 3 結果

126 プライマーについて1次スクリーニングを行った結果、6 プライマー（4.8 %）では全く増幅が起こらなかった。33 プライマー（26.2 %）では供試した5クローン間で変異がなく、単型的であった。一方、87 プライマー（69.1 %）は、供試クローン間で多型的であった。87 プライマーのうち、57 プライマーは複雑な電気泳動像を示したが、30 プライマーはフラグメントの有無が明瞭に識別できた。そこで、これらの30 プライマーについて、16 クローンの全てを用いて2次スクリーニングを行った。その結果、12 プライマーを用いた場合に増幅される14個のフラグメントが、付近に紛らわしい他のフラグメントがなく、マーカーの候補として選抜された。これらの14個のフラグメントについて、5回のPCR反応による再現性テストを実施した。再現性テストの結果の一部をFig 2.2-3に示す。プライマーG-14の380bp付近のフラグメントは、波方ーク73号（写真左側）が保有し、小浜ーク30号（写真右側）は保有しない。5回の独立したPCR反応において、波方ーク73号には常に明瞭なフラグメントが出現し、小浜ーク30号にはその付近に一度も紛らわしい他のフラグメントが存在しなかった。このような再現性テストの結果、9 プライマーを用いた場合に増幅される10個のフラグメントが、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成するクローンの識別に有効なマーカーとして取得できた。

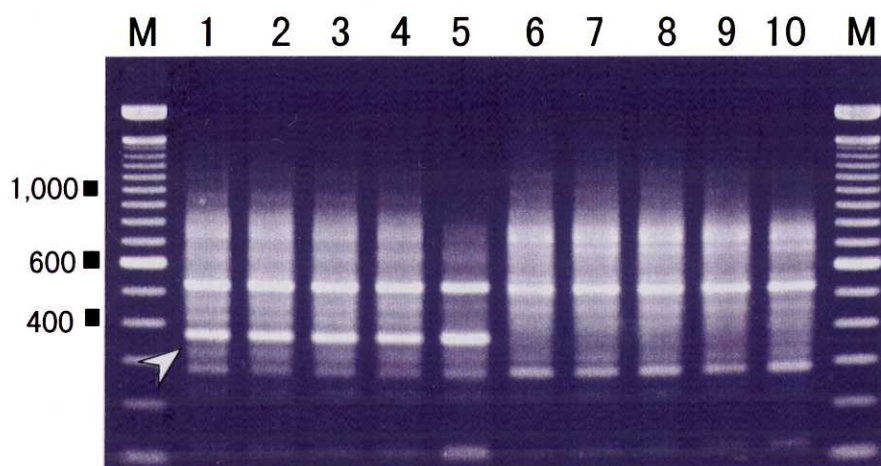


Fig 2.2-3 Agarose gel electrophoretic pattern of PCR amplification products in the reproducibility test with primer G-14.

Lanes 1-5 and lanes 6-10 represent the amplification products of 5 consecutive PCRs for two clones, Namikata-(t)73 and Obama-(t)30, respectively.

Polymorphic DNA fragments are identified by an *arrow*.

M represents the 100bp marker (GIBCO BRL).

マーカーが出現した場合は”1”、出現しなかった場合は”0”と標記し、各クローンの表現型をクローン間で比較した。U-03(700bp)とU-09(610bp)のマーカーを例にとって、表現型による分類を行うと、両方とも出現したタイプ(1, 1)が土佐清水ーク 63 号、夜須ーク 37 号、川内ーク 290 号の 3 クローン、U-03(700bp)のみ出現したタイプ(1, 0)が波方ーク 73 号、額娃ーク 425 号、津屋崎ーク 50 号、三崎ーク 90 号、大瀬戸ーク 12 号、田辺ーク 54 号、三豊ーク 103 号、小浜ーク 24 号の 8 クローン、U-09(610bp)のみ出現したタイプ(0, 1)が大分ーク 8 号の 1 クローン、どちらも出現しなかったタイプ(0, 0)が小浜ーク 30 号、波方ーク 37 号、志摩ーク 64 号、吉田ーク 2 号の 4 クローンであった (Fig 2.2-4)。すなわち、大分ーク 8 号は、これら 2 つのマーカーによって他のクローンと識別することができた。取得した全 10 マーカーによる表現型をクローン間で比較した結果、各クローンの表現型は 16 クローンそれぞれに固有であり、これらのマーカーを用いて互いに識別することが可能であった (Table 2.2-1)。

次に、これらのマーカーを用いて福岡県森林林業技術センター内にクローン集植されていた個体とマーカーの選抜に用いた個体を比較したところ、同一クローンの個体間ではその表現型が全く同一であった。また、福岡県森林林業技術センターと森林総合研究所の 2 つの研究機関において、福岡県採種園の 16 クローン各 1 個体の DNA を共通に用いて、取得した 10 個のマーカーによる RAPD 分析を行った結果、同一クローンの表現型は研究機関の間で全く同一であった。

遺伝的に異なる個体の表現型が、偶然に採種園構成クローンと一致する確率を、マーカーの出現頻度を掛け合わせて算定した結果、小浜ーク 24 号の 0.00030 (約 3296 分の 1) から額娃ーク 425 号の 0.034 (約 30 分の 1) の範囲で、16 クローンの平均では 0.0090 (約 110 分の 1) であった (Table 2.2-1)。

2. 2. 4 考察

本研究で用いた 16 クローンは、西日本地域という比較的狭い範囲から選抜されていたため、RAPD マーカーが十分な変異を示すかどうかの一つの課題であった。マーカーの探索により取得した 10 個のマーカーによる表現型は、16 クローンそれぞれに固有であり、互いに識別できることが明らかとなった。Van de Ven and McNicol(1995)は Sitka spruce (*Picea sitchensis*)の採種園を構成する 57 クローンを、Scheepers ら(1997)は Norway spruce (*Picea abies*)の精英樹 96 クローンを、それぞれ 6 個と 4 個の RAPD プライマーを用いて

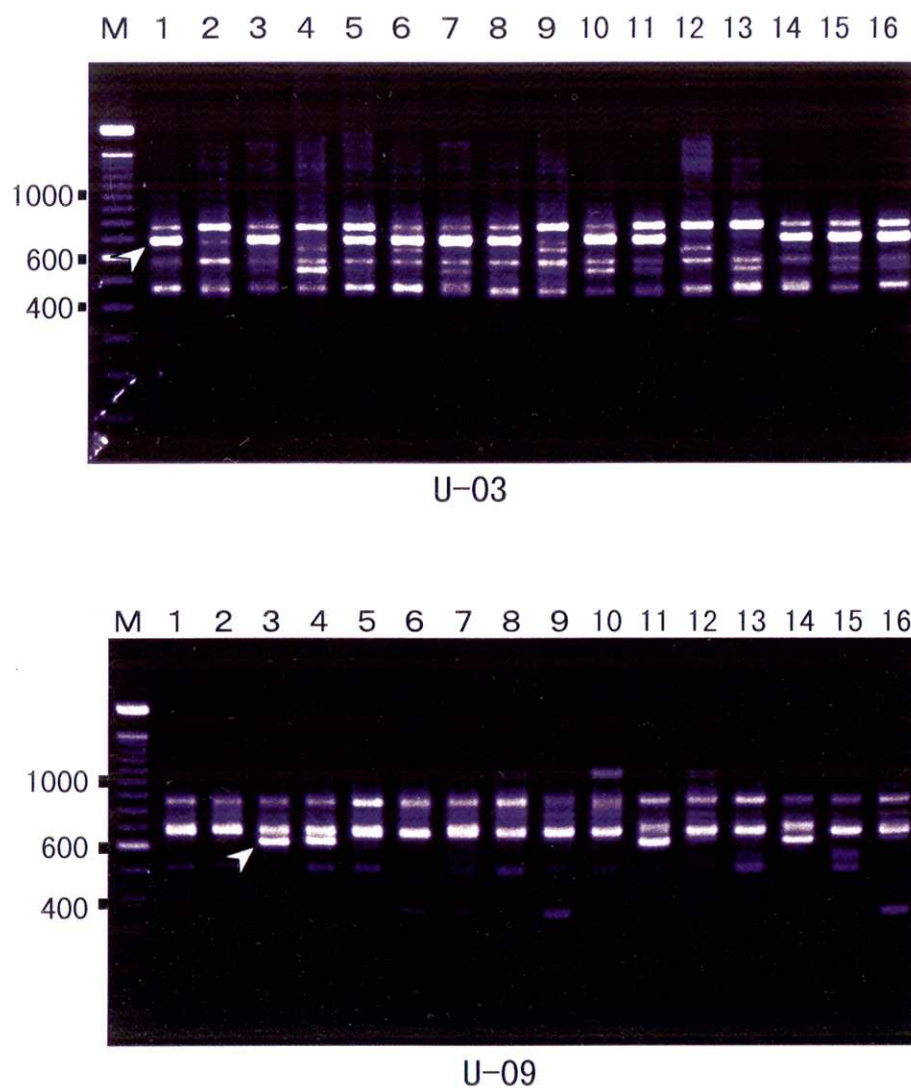


Fig 2.2-4 Agarose gel electrophoretic pattern of PCR amplification products obtained with the 16 resistant clones in Japanese black pine using primers U-03 and U-09.

Polymorphic DNA fragments are identified by *arrows*. Lane M represents the 100 bp marker (GIBCO BRL), 1: Namikata-(t)73, 2: Obama-(t)30, 3: Tosashimizu-(t)63, 4: Ooita-(t)8, 5: Ei-(t)425, 6: Tsuyazaki-(t)50, 7: Misaki-(t)90, 8: Ooseto-(t)12, 9: Namikata-(t)37, 10: Tanabe-(t)54, 11: Yasu-(t)37, 12: Shima-(t)64, 13: Yoshida-(t)2, 14: Sendai-(t)290, 15: Mitoyo-(t)103, 16: Obama-(t)24

Table 2.2-1 RAPD phenotypes of orchard clones in Japanese black pine seed orchards.

Clone	(Primer) (bp)	A-19 900	G-14 380	G-17 590	P-14 900	S-18 700	U-03 700	U-06 950	U-09 610	U-13 580	ρ^*
Namikata—(t)73		1	1	1	0	0	1	1	0	1	0.0011
Obama—(t)30		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.0072
Tosashimizu—(t)63		1	0	0	0	0	0	1	1	1	0.0005
Oita—(t)8		0	0	1	0	1	1	0	1	0	0.0003
Ei—(t)425		0	0	1	0	0	1	1	0	1	0.0337
Tsuyazaki—(t)50		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.0157
Misaki—(t)90		0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.0157
Ooseto—(t)12		0	0	0	1	0	1	1	0	0	0.0119
Namikata—(t)37		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.0021
Tanabe—(t)54		0	0	1	1	0	1	1	0	1	0.0153
Yasu—(t)37		0	0	1	0	0	1	1	1	0	0.0112
Shima—(t)64		0	0	0	1	0	1	0	0	1	0.0054
Yoshida—(t)2		0	0	1	0	0	1	0	0	1	0.0153
Sendai—(t)290		0	0	1	1	0	1	1	1	0	0.0051
Mitoyo—(t)103		1	0	0	0	0	1	1	0	0	0.0036
Obama—(t)24		0	1	1	1	0	0	1	0	1	0.0003
Average											0.0090

ρ^* : The proportion that phenotype of different genotypes is identical to those of each orchard clone.

識別している。また、全兄弟家系 (Full-sib family) は最も遺伝的に近縁であると考えられるが、Keil and Griffin(1994)は、20 個の RAPD プライマーを用いて、*Eucalyptus nitens* の全兄弟家系 19 個体とその両親を互いに識別している。したがって、RAPD マーカーは、構成クローンの遺伝的由来やクローン数にかかわらず、採種園を構成するクローン間の変異を十分に検出できると考えられた。

クローン識別を行うマーカーは、クローン内では生育段階や環境の違いによる変異を生じないことが望まれる。本研究で、異なる場所に植栽された同一クローンの 2 個体を分析した結果、それらの表現型は全く同一であった。このように、同一クローンの複数のラメートが同一の表現型を示すことは、Poplar(*Populus* spp.) 精英樹クローン (Castiglione *et al.*, 1993)、*Eucalyptus* 精英樹クローン (Keil and Griffin, 1994)、リンゴ品種 (Koller *et al.*, 1993)、Sitka spruce 採種園構成クローン (Van de Ven and McNicol, 1995)、ハゼノキ品種 (後藤ら, 1997)、Norway spruce 精英樹クローン (Scheepers *et al.*, 1997)、スギ品種 (後藤ら, 1999) などでも確認されている。また、Keil and Griffin(1994)は、*Eucalyptus nitens* と *Eucalyptus globulus* 2 種について、同一個体から採取した未熟葉と成葉を用いて RAPD 分析を行い、これらの表現型が生育段階によらず一致したとした。したがって、RAPD マーカーは、クローン内では生育段階や環境の違いによる変異を生じないと考察された。以上のことから、RAPD マーカーは、Bailey(1983)の提唱するクローン識別の指標としての基準を満たしていると考えられた。

本研究では、再現性の高いフラグメントのみを選抜し、信頼性の高いクローン識別法を確立することがもう一つの課題であった。RAPD 分析では、プライマー・鋳型 DNA・MgCl₂ の濃度、アニーリング温度、使用する PCR 装置、ポリメラーゼの種類などが増幅産物のフラグメントパターンに影響を与えることが知られている (Ellsworth *et al.*, 1993; Kernodle *et al.*, 1993; Penner *et al.*, 1993; Schierwater and Ender, 1993)。これらの条件を最適化しても、再現性の低いフラグメントが非特異的に増幅することがある。Skroch and Nienhuis(1995)は、Snap-bean (*Phaseolus vulgaris*) を用いて RAPD 分析を 2 回行い、増幅された全てのフラグメントの再現性を検討した。そして、Skroch and Nienhuis(1995)は、その再現性がフラグメントによって大きく異なることを指摘した。フラグメントの再現性を検討する方法には、1) 同一クローンの複数のラメート間で比較する、2) 異なる PCR 反応間で比較する、という 2 つのやり方がある。しかし、同一クローンの複数のラメート間で比較をした場合、増幅された全てのフラグメントが再現性を示したとする報告が多く (Koller *et al.*,

1993; Keil and Griffin, 1994; Van de Ven and McNicol, 1995; Scheepers *et al.*, 1997)、フラグメント間の再現性の高低を比較するのには向いていないと考えられる。Koller ら (1993) は、リンゴ 2 品種を用いて 4 回の PCR 増幅を行い、ラメート間で再現性が得られたフラグメントの中に、PCR 間では再現性が得られないものがあつたとしている。したがって、再現性の低いフラグメントを排除し、信頼性の高い識別法を確立するには、本研究で行ったように異なる PCR 間で再現性を検討する方法が適していると考えられる。

本研究で取得した 10 個のマーカーは、異なる研究機関における分析でも高い再現性を示した。Skroch and Nienhuis(1995)は、フラグメントの明瞭度と再現性の関係を調べ、明瞭度の低いフラグメントは 60 %、中程度のフラグメントは 83 %、明瞭度の高いフラグメントは 96 %の再現性が得られたとしている。また、Heun and Helentjaris(1993)は、フラグメントの明瞭度の差による変異は、その再現性が乏しいとしている。本研究で取得できたマーカーは全て明瞭度が高く、その有無が容易に判断できるものであつた。また、Penner ら (1993) は、Oat(*Avena sativa*)の 2 品種を用いて、異なる 6 つの研究室でそれぞれ RAPD 分析を行い、研究室間では増幅されるサイズ領域が異なり、1400bp 以上、もしくは 480bp 以下のフラグメントの再現性が著しく低かつたとしている。本研究で用いた条件下では、150 ~ 1,200bp の大きさのフラグメントが確認されたが、取得したマーカーは最小で G-14 の 380bp 付近、最大で U-06 の 950bp 付近と確認された全てのフラグメントサイズの中で中程度であり、この点も再現性を高める一因となっていると考えられる。したがって、マーカーを探索する際には、1) 明瞭度が高い、2) 容易に有無が判別でき、紛らわしい他のフラグメントがない、3) サイズが中程度である、といった条件を満たしているフラグメントを選抜するのが効率的であると考えられた。

本研究で取得した 1 プライマー当たりのマーカー数は 1 ~ 2 個であり、ハゼノキ品種の 1 ~ 3 個 (後藤ら, 1997)、スギ品種の 1 個 (後藤ら, 1999) と同程度であつた。使用する PCR 装置や酵素などの諸条件によって、1 プライマー当たりに増幅されるフラグメントの数は異なる。しかし、その違いを考慮しても、Sitka spruce 採種園構成クローンでは 4 個 (Van de Ven and McNicol, 1995)、*Eucalyptus* 精英樹クローンでは 4 ~ 5 個 (Keil and Griffin, 1994)、リンゴ品種では 14 個 (Koller *et al.*, 1993)、Poplar 精英樹クローンでは 27.6 個 (Catiglione *et al.*, 1993) と、多数のマーカーを識別に利用している例が多い。クローン識別を効率的に行うためには、プライマー当たりのマーカー数が多い方が有利である。しかし、RAPD マーカーの再現性が一部の研究者により厳しく批判された理由には、再現性

の低いフラグメントをマーカーとして用いたことが原因となっているのではないかと考えられる。品種識別あるいはクローン識別では、一つのマーカーが本来とは異なる表現型を示すと、その個体は異なるクローンとして識別されることになる。したがって、プライマー当たりのマーカー数を少なくしても、絶対的な再現性を持つフラグメントのみをマーカーとして使用すべきであると考えられる。

クローン採種園では、接ぎ木によって構成個体を育成することが多い(Hong, 1975)。接ぎ木の場合、接ぎ木後の保育管理が悪いと台木が立ち上がる可能性がある(百瀬, 1969)。我が国では、接ぎ木個体の台木は一般実生苗を用いることが多い。また、床替え時のクローンの取り扱いなどにより、採種園構成クローン以外の不正規な個体が採種園に混入する可能性もある。そこで、台木が立ち上がりや不正規個体の混入に対して、本研究で得られた 10 個のマーカーによる検出能力を検討した。台木あるいは不正規個体の表現型が採種園構成クローンと偶然に一致する確率は、0.034 (約 30 分の 1) ~ 0.00030 (約 3296 分の 1) の範囲であり、16 クローンの平均では 0.0090 (約 110 分の 1) であった。マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園の個体数は 200 個体程度であるところが多く、その場合の 1 クローン当たりのラメート数は 12 ~ 13 個体である。したがって、本研究で取得した 10 個のマーカーを用いてクローン識別を行う場合、台木の立ち上がりや不正規個体の混入を検出できる可能性が高いと考えられた。

第3節 クローン識別法の簡便化（バルク分析）

2. 3. 1 はじめに

前2節では、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成する 16 クローン間で多型的で再現性の高い RAPD マーカーを探索取得し、信頼性の高いクローン識別法を開発することができた。したがって、この方法を用いることにより、採種園構成個体の遺伝子管理を行うことができるようになった。しかし、採種園は非常に多数の個体で構成されているため、全ての個体から個別に DNA を抽出し、RAPD 分析を行うには莫大な時間、労力、コストがかかる。特に、DNA 抽出作業には多くの複雑な工程があり、現実的に処理できるサンプル数には限界がある。バルク法(Bulking method)は、DNA 抽出および RAPD 分析の簡便化法として、耐病性遺伝子に連鎖したマーカーの探索 (Michelmore *et al.*, 1991)、集団間の類縁関係の解明 (Yu and Pauls, 1993; Scheepers *et al.*, 1997)、人工交配苗の正確性の確認 (白石・前田, 1994) など、有効に用いられてきた。これを採種園におけるクローン識別に応用すれば、クローン配置の誤りや不正規個体の混入などを簡便に検出できる。しかし、これまでバルク法の採種園構成クローンの識別への利用例はなく、その方法の確立が求められている。

本節では、2つのクローンを異なる割合で混合したサンプルを調製し、混合サンプルから抽出した DNA を用いて RAPD 分析を行った。そして、混合サンプルと単一クローンの表現型を比較し、遺伝的に異なる個体の混入が検出できるかどうかを検討した。特に、混合した量が少ないクローンが保有するマーカーが、混合サンプルに出現するかどうかについて検討した。

2. 3. 2 材料と方法

供試材料は、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成する 16 クローンのうち、志摩ーク 64 号、吉田ーク 2 号、波方ーク 73 号、小浜ーク 30 号、土佐清水ーク 63 号の 5 クローンである。供試した個体は、前2節と同様、福岡県小郡市のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園（以下、福岡県採種園とする）の南側最前列に植栽された各クローン 1 個体である。まず、2 クローンの針葉をそれぞれ 150mg と 50mg の量で混合した 6 種類のサンプルを調製し (Table 2.3-1)、各混合サンプルからの DNA 抽出を行った。DNA の抽出方法は、前2節と同様である。そして、抽出した DNA を 1 サンプル分の鋳型 DNA

Table 2.3-1 Contents of bulked samples used in the study.

Bulk No.	Contents			
Bulk 1	Shima-(t)64	150mg	+ Namikata-(t)73	50mg
Bulk 2	Shima-(t)64	150mg	+ Obama-(t)30	50mg
Bulk 3	Shima-(t)64	150mg	+ Tosashimizu-(t)63	50mg
Bulk 4	Yoshida-(t)2	150mg	+ Namikata-(t)73	50mg
Bulk 5	Yoshida-(t)2	150mg	+ Obama-(t)30	50mg
Bulk 6	Yoshida-(t)2	150mg	+ Tosashimizu-(t)63	50mg

として RAPD 分析を行い、混合した 2 クローンと混合サンプルの表現型を比較した。

本節で用いたマーカーは、前 2 節で選抜された 10 個のマーカーのうち、U-06(950bp)を除く 9 個のマーカーに、前 2 節と同様の条件で新たに選抜した A-09(510bp), A-17(750bp), D-03(700, 800bp), F-03(720bp), F-05(710bp), F-16(610bp), I-10(530, 750, 800bp), V-17(470bp)の 11 個のマーカーを加えた合計 20 マーカーである。

2. 3. 3 結果

本研究で供試した 20 個のマーカーについて、混合した単一のクローンと混合サンプルの表現型を、マーカーが出現した場合は” + ”、出現しなかった場合は” - ”として Table 2.3-2 に示した。まず、150mg 混合した志摩ーク 64 号と 50mg 混合した波方ーク 73 号、小浜ーク 30 号、土佐清水ーク 63 号の 3 クローン、そして 3 種類の混合サンプル(Bulk 1, 2, 3)の表現型を比較した。マーカー D-03(700bp)と V-17(470bp)について、これらの電気泳動像の一部を Fig2.3-1 に示す。混合した 2 クローンと混合サンプルの表現型を比較した結果、混合した 2 クローンがどちらも保有していないマーカーは、混合サンプルでは全て出現しなかった。例えば、D-03(700bp)のマーカーは、志摩ーク 64 号も小浜ーク 30 号も保有していないが、これらの 2 クローンを混合した Bulk 2 にも出現しなかった。次に、混合した 2 クローンがどちらも保有しているマーカーは、混合サンプルでは必ず出現した。例えば、V-17(470bp)のマーカーは、志摩ーク 64 号も土佐清水ーク 63 号も保有しているが、これらの 2 クローンを混合した Bulk 3 でも同様に出現した。また、150mg 混合したクローンのみが保有していたマーカーは、混合サンプルでは必ず出現した。例えば、V-17(470bp)のマーカーは、志摩ーク 64 号が保有し、波方ーク 73 号と小浜ーク 30 号は保有しないが、これらを混合した Bulk 1 と Bulk 2 には出現した。

本研究で特に課題としたのは、50mg 混合したクローンのみが保有していたマーカーが混合サンプルに出現するかどうかである。例えば、D-03(700bp)のマーカーは、50mg 混合した波方ーク 73 号と土佐清水ーク 63 号は保有しているが、150mg 混合した志摩ーク 64 号は保有していない。このマーカーは、これらを混合した Bulk 1 と Bulk 3 において出現した (Fig 2.3-1)。ほとんどの場合、50mg 混合したクローンのみが保有していたマーカーは、このように混合サンプルに出現した。しかし、A-19(900bp)のマーカーは、50mg 混合した土佐清水ーク 63 号が保有しているにもかかわらず Bulk 3 では出現せず、G-14(380bp)のマーカーは、50mg 混合した波方ーク 73 号が保有しているにもかかわらず Bulk 1

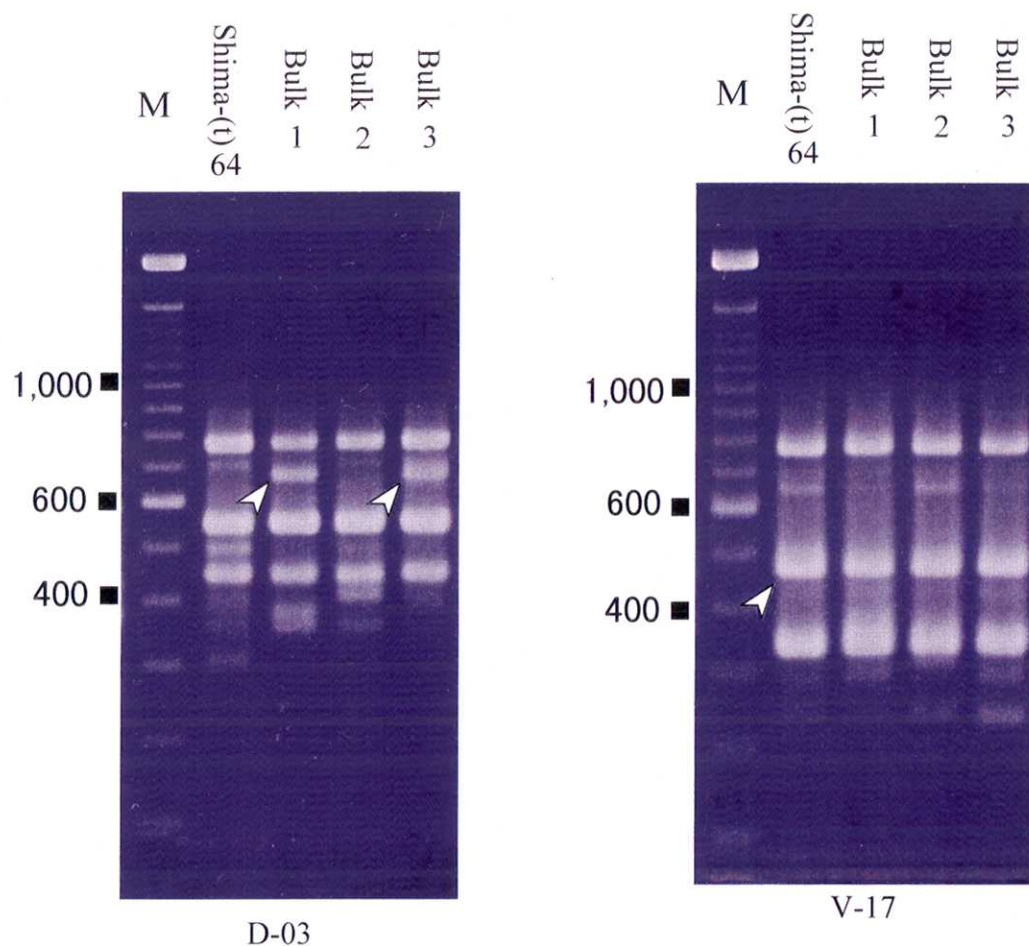


Fig 2.3-1 Agarose gel electrophoretic patterns of bulked samples consisting of different genotypes.

This electrophoretic profiles showed a part of PCR products using RAPD primer D-03 and V-17.

Lane M: 100bp size marker (Gibco BRL),

Bulk 1: Shima-(t)64 (150mg) + Namikata-(t)73 (50mg),

Bulk 2: Shima-(t)64 (150mg) + Obama-(t)30 (50mg),

Bulk 3: Shima-(t)64 (150mg) + Tosashimuzu-(t)63 (50mg),

Arrows represents RAPD markers used in this study.

Table 2.3-2 Comparison of RAPD phenotypes between single clones and bulked samples.

Primer	bp	Bulk 6	Tosashimizu-(t)63	Yoshida-(t)2	Bulk 5	Obama-(t)30	Yoshida-(t)2	Bulk 4	Namikata-(t)73	Yoshida-(t)2	Bulk 3	Tosashimizu-(t)63	Shima-(t)64	Bulk 2	Obama-(t)30	Shima-(t)64	Bulk 1	Namikata-(t)73	Shima-(t)64
A-09	510				+			+			+			+			+		
A-17	750																		
A-19	900																		
D-03	700																		
	800																		
F-03	720																		
F-05	710																		
F-16	610																		
G-14	380																		
G-17	590																		
I-10	530																		
	750																		
	800																		
P-14	800																		
	900																		
S-18	700																		
U-03	700																		
U-09	610																		
U-13	580																		
V-17	470																		

+: Present, -: Absent

- *: RAPD fragment was absent in bulked samples, nevertheless one of two clones possessed the fragment.

では出現しなかった。

次に、150mg 混合した吉田ーク 2 号、50mg 混合した波方ーク 73 号、小浜ーク 30 号、土佐清水ーク 63 号の 3 クローン、ならびに 3 種類の混合サンプル (Bulk 4, 5, 6) におけるマーカの表現型を比較した。その結果は、ほとんど志摩ーク 64 号の場合と同様であった。吉田ーク 2 号の場合においても、50mg 混合したクローンのみが保有する A-19 (900bp) と G-14 (380bp) の 2 つのマーカは、やはり混合サンプルに出現しなかった (Table 2.3-2)。

以上の結果をまとめたものが Table 2.3-3 である。ほとんどの場合、単一クローンのいずれかが保有するマーカは混合サンプルに出現した。しかし、50mg 混合したクローンのみが保有したマーカの中には混合サンプルに出現しないものが認められた。

A-19 (900bp) と G-14 (380bp) の 2 つのマーカを除いて、150mg 混合したクローンと混合サンプル、すなわち志摩ーク 64 号と Bulk 1, 2, 3、そして吉田ーク 2 号と Bulk 4, 5, 6 の表現型をそれぞれ比較した結果、少なくとも 1 つ以上のマーカの表現型がそれぞれ異なっていた (Table 2.3-2)。

2. 3. 4 考察

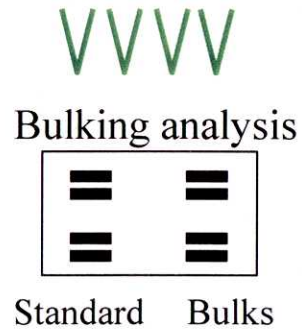
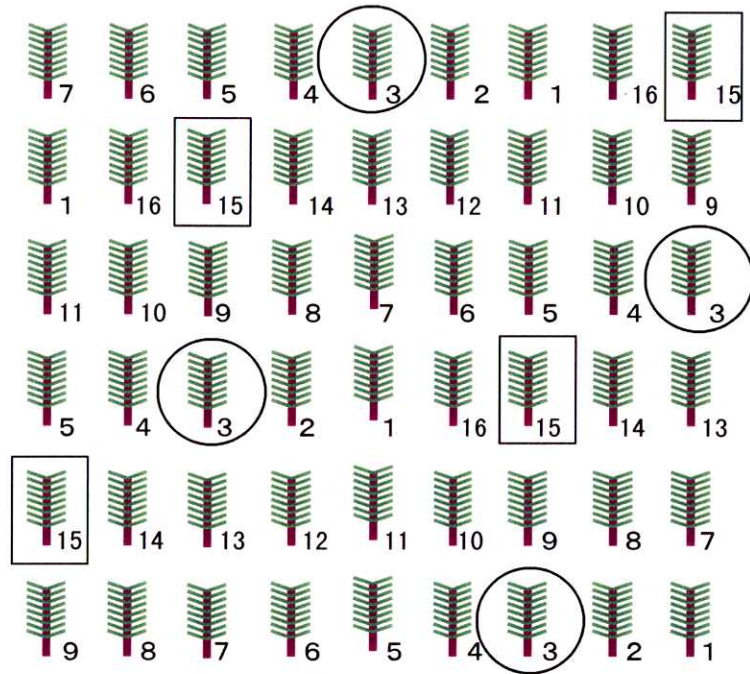
本研究では、2 つのクローンを 150mg と 50mg の割合で混合したサンプルを調製し、サンプル量全体の 4 分の 1 に相当する 50mg のクローンが保有するマーカが、混合サンプルに出現するかどうかを検討した。ほとんどの場合、これらのマーカは混合サンプルに出現し、6 種類の混合サンプルの表現型は 150mg 混合したクローンの表現型とはそれぞれ異なっていた。つまり、サンプル全体の 4 分の 1 の量が異なる遺伝組成となっていれば、単一クローンの場合とは異なる表現型を示し、異なるクローンの存在が検出できることが明らかとなった。したがって、異なる 4 個体の針葉を等量混合した場合、4 個体中 1 個体でも異なるクローンがあれば、その存在を検出できることが示された。

この方法を実際の採種園における遺伝子管理に応用するには、以下のような手順が考えられる。1) 植栽位置図においてクローン名が同一な個体の針葉を個別に収集する、2) 収集した各個体の針葉を等量、4 個体分混合する、3) 混合したサンプルから DNA 抽出および RAPD 分析を行い、各クローンの基準個体と混合サンプルの表現型を比較する。ここで、もし表現型が一致すれば混合した 4 個体のクローンは正確であり、表現型が一致しなければ混合した 4 個体の中に本来とは異なるクローンが混入していることが判明す

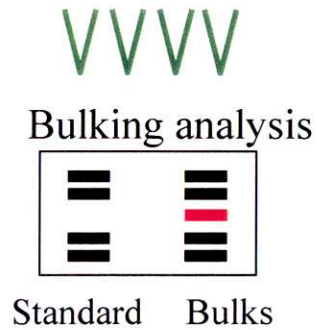
**Table 2.3–3 RAPD phenotypes in the bulked samples
detected in this study.**

Phenotypes in the single clones		Phenotype in the bulk samples
Clone (150mg)	Clone (50mg)	
Absent	Absent	All, Absent
Present	Present	All, Present
Present	Absent	All, Present
Absent	Present	Almost, Present ^a

Almost, Present ^a : Out of 20 RAPD markers, 18 markers were present,
but 2 markers were absent.



No contamination
within clone No.3



Any contaminations
within clone No.15

Fig 2.3-2 Procedure of checking the genetic identity of ramets with bulking.

る。Fig2.3-2 の場合、クローン No.3 は基準個体と混合サンプルの表現型が一致しているので、収集した○印の4個体は全て正しく配置されていたことが分かる。一方、クローン No.15 は基準個体にはないマーカーが混合サンプルに出現しているので、収集した□印の4個体のうち少なくとも1個体は本来とは異なるクローンであると考えられる。このような方法を用いることにより、1サンプル分のDNA抽出とRAPD分析を行うことによって、4個体のクローンの正確性を検討することができる。しかし、この方法では、混合サンプルの表現型が基準個体と一致しなかった場合、4個体の中でどれが本来とは異なる遺伝組成を持つ個体であるのかを知ることはできない。したがって、表現型が一致しなかった混合サンプルを構成する個体からは、個別にDNAを抽出し、前2節の方法でクローン識別を行う必要がある。

Yu and Pauls(1993)は、Alfalfa(*Medicago sativa*)の1つの育種集団に由来する5個体を用いて、RAPD分析を3～5回繰り返して行い、再現性の高い合計7個のマーカーを得ている。さらに、Yu and Pauls(1993)は、これら5個体のDNA溶液の等量混合したものを鋳型DNAとしてRAPD分析し、混合サンプルでは7個のマーカーのうち6個のマーカーが認められたが、残る1個のマーカーは認められなかったとした。この結果は、混合サンプルでは供試したクローンが保有するほとんどのマーカーが出現したが、マーカーによって例外が認められたという点で、本研究の結果と非常によく一致している。つまり、個別に用いる場合には高い再現性を示すマーカーであっても、混合サンプルでは検出できないマーカーが存在する。したがって、バルク分析を行う場合、本研究で行ったように、事前に各マーカーの検出能力を検討する必要がある。このように混合サンプルで検出できなかったマーカーは、Michelmoresら(1991)が指摘したように、PCR増幅時の初期段階で他のマーカーとの競合によってうまく結合できないのが増幅できない原因であると考えられる。Yu and Pauls(1993)は、7つのマーカー中で最もサイズが大きいマーカーが検出できなかったとしている。本研究で検出できなかった2つのマーカーのうち、A-19(900bp)は用いたマーカーの中では最もサイズが大きく、G-14(380bp)は最もサイズが小さかった。したがって、バルク法で用いるマーカーは、個別に分析する場合に比べて、より中程度のサイズ領域のものを選ぶ必要があると考察された。

本研究では、DNAの抽出作業をいかに省力化するかがもう一つの課題であった。Yu and Pauls(1993)や白石・前田(1994)は、個別に抽出したDNA溶液を混合したサンプルを用いて、バルク法によるマーカーの検出能力を検討している。しかし、抽出されるDNAの

量や純度は個体ごとに異なるため、DNA 溶液を混合する場合と針葉サンプルを混合する場合では、結果が異なる可能性もある。本研究では、針葉の混合サンプルを用いて DNA 抽出と RAPD 分析を行ったが、その場合でも、バルク法は異なるクローンの存在を検出するのに有効であった。したがって、DNA 抽出作業は、バルク法を用いることで省力化できることが明らかとなった。

本研究では、採種園において4個体を等量混合することを想定して、マーカーの検出能力を検討した。混合する個体数が少ないほど混入した不正規な個体の存在は検出しやすくなるが、省略できる実験量は少ない。逆に、混合する個体数が多いほど省略できる実験量は多くなるが、マーカーの検出能力は低くなる。白石・前田(1994)は、スギ(*Cryptomeria japonica*)の人工交配の正確性を検討するのにバルク法が有効であるとし、実験的に混合したサンプルでは全体の64分の1の量でも検出できるマーカーが認められたとしている。筆者は、本研究を行う前に混入するサンプルの量を全体の15分の1にして、バルク法による検出能力を検討したが、検出不能なマーカーが多数認められた(未発表)。したがって、そのように検出能力が高いマーカーは少ないと考えられる。Michelmoreら(1991)は、*Lactuca saligna*と*L. sativa*の2種を異なる割合で混合したサンプルを用いて、マーカーの検出能力を比較している。混合するDNAの量を全体の0.5, 0.4, 0.2, 0.1, 0.04, 0.02, 0.001の段階別に分けてバルク分析を行った結果、0.2(5分の1)までは検出できたが、0.1(10分の1)ではかろうじて検出できる程度であり、それ以下では検出できなかったとしている。以上のことを考慮すると、一度に混合する個体数は3個体～5個体程度が適当であると考えられた。

第4節 採種園産種苗の花粉親識別法の開発

2. 4. 1 はじめに

採種園が造林種苗の供給に対して重要な役割を果たすようになるとともに、採種園産種苗の遺伝組成や遺伝的品質がますます重要視されるようになってきた (Szmids, 1987)。こうした課題に対してこれまで、アイソザイムマーカーを用いた採種園における外来花粉の花粉汚染や、自殖の実態解明が行われてきた (Shen *et al.*, 1981; Shaw and Allard, 1982; Di-Giovanni and Kevan, 1991; Wheeler and Jech, 1992)。しかし、用いる酵素種が限定されるアイソザイムマーカーでは、採種園産種苗の花粉親を数多くの採種園構成クローンの中から特定することは困難であり (Rudin and Lindgren, 1977)、White spruce (*Picea glauca*) の採種園における報告例 (Schoen and Stewart, 1986) が見られる程度である。近年、新たな DNA マーカーが開発されつつあるが、依然として採種園産種子の花粉親識別に有効なマーカーは少なく、Stoher ら (1998) が cp-SSR マーカーを用いて Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) の採種園の交配実態を解明した以外は報告例がない。

本研究では、採種園産種子の花粉親識別マーカーとして、DNA 分子マーカーの一つである RAPD マーカーに着目した。筆者は、本章の第2節、第3節において、RAPD マーカーがマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園のクローン間で十分な変異を示すことを実証した。Welsh ら (1991) や Scott ら (1992) は、RAPD マーカーを用いた種子親および花粉親分析の可能性を示唆し、Åkerman ら (1995) は、Europe white birch (*Betula pendula*) の人工交配苗の種子親を2クローンの候補の中から特定することに成功している。しかし、RAPD マーカーは優性マーカーであり、その表現型から優性ホモ型 (AA) とヘテロ型 (Aa) とを区別することができない (Williams *et al.*, 1990; Carlson *et al.*, 1991)。そのため、RAPD マーカーは少数の候補の中から親を決定する場合には有効であるが、候補の数が多い場合には共優性のアイソザイムマーカーや RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) マーカーなどに比べて、識別能力が低いと考えられている (Roy *et al.*, 1992; Åkerman *et al.*, 1995)。

一方、RAPD マーカーの遺伝に関する研究から、親個体が保有する RAPD マーカーは、F₁ 世代ではメンデルの法則に従って分離することが *Butula alleghaniensis* (Roy *et al.*, 1992)、Douglas-fir と White spruce (Carlson *et al.*, 1991)、Scots pine (*Pinus sylvestris*) (Lu *et al.*, 1995) などで確認された。針葉樹は、雌性配偶体が半数体であることが知られている (Bartels,

1971)。近年、この雌性配偶体において、親個体の保有する RAPD マーカーがメンデルの法則に従って分離することが White spruce (Tulsieram *et al.*, 1992)、Slash pine(*Pinus elliottii* var. *elliottii*)(Nelson *et al.*, 1993)、Scots pine (Lu *et al.*, 1995) などで明らかにされている。このことを利用して、Lu ら(1995)は、Scots pine の 10 個の雌性配偶体を RAPD 分析することにより、親個体の遺伝子型を推定することに成功している。採種園では、容易に各クローンの種子、つまり雌性配偶体を得ることができる。したがって、Lu ら(1995)の方法を応用すれば、各クローンの複数の雌性配偶体を分析することによって、その遺伝子型を決定することができる。

各クローンの遺伝子型が決定できれば、各交配組合せにおける RAPD マーカーの表現型は限定される。採種園からクローン別に採種し、育成した実生苗の母親は明らかであるため、取得したマーカーについて、実生苗の表現型と採種園構成クローンの遺伝子型とを比較することにより花粉親を識別できる可能性がある。

本節では、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園において、最も種子生産性の高い田辺ーク 54 号(後藤・宮原, 2000)を母親クローンとして選び、このクローン of 自然交配実生苗の花粉親識別法を開発した。まず、プライマーのスクリーニングを行い、先にクローン識別に用いたマーカーに加えて、新たに多くのマーカーを開発した。そして、Lu ら(1995)の方法を応用して、採種園を構成する 16 クローン of 自然交配種子 10 個から摘出した雌性配偶体を用いて、取得したマーカーごとに全てのクローンの遺伝子型を決定した。さらに、人工交配苗の分析を行い、供試した花粉親の遺伝子型と人工交配苗の表現型が矛盾しないかどうかの検討を行った。

2. 4. 2 材料と方法

供試材料および DNA 抽出と RAPD 分析

供試材料を Table 2.4-1 に示した。マーカー選抜には、本章第 2 節と同じく、福岡県小郡市のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成する 16 クローン各 1 個体の針葉約 150mg を用いた。また、取得した RAPD マーカーについて、各クローンの遺伝子型を決定するために、各クローン 10 個 of 自然交配種子から摘出した雌性配偶体を用いた。そして、決定された各クローンの遺伝子型の正確性を検討するために、田辺ーク 54 号を母親とする人工交配苗、3 交配組合せ各 8 個体、合計 24 個体の針葉約 150mg を用いた。なお、人工交配苗の花粉親として用いたのは、津屋崎ーク 50 号、三崎ーク 90 号、志摩ー

Table 2.4-1 Description of plant materials used in this study.

Objective	Plant materials	Origin
Marker selection	150mg of needles of 16 orchard clones One individual per clone was used.	Fukuoka Pref. For. Res. & Exten. Center.
Fingerprinting of orchard genotypes	Ten haploid megamamephytes taken from open-pollinated half-sib seeds per clone	Cones were collected from seed orchard in Oogori, Fukuoka pref. in 1998.
RAPD analysis of controlled-crosses	Tanabe-(t)54 (♀) × Tsuyazaki-(t)50 (♂) Tanabe-(t)54 (♀) × Misaki-(t)90 (♂) Tanabe-(t)54 (♀) × Shima-(t)64 (♂)	Two-years old seedlings (8 seedlings per cross) pollinated in For. Res. Center of Miyazaki pref.

ク 64 号の 3 クローンである。雌性配偶体からの DNA 抽出方法は、摘出した雌性配偶体の全てを用いて、第 2 節と同様に行った。RAPD 分析の諸条件は全て第 2 節と同様である。

マーカーの探索

花粉親識別では、より多くの情報が必要とされるため、クローンの識別に比べてさらに多くのマーカーが必要であると考えられる。そこで、第 2 節でスクリーニングを行った 126 プライマーに加えて、さらにオペロン社製 RAPD プライマー 200 種類 (C, D, F, H, I, M, V, W, X, Y シリーズ) を用いてマーカーの探索を行った。マーカー探索の条件は、母親である田辺ーク 54 号が保有せず、他の 15 クローン間で多型的かつ明瞭であることとした。そして、少なくとも 3 回以上の独立した PCR 反応で再現性があり、供試した 16 クローンの全てにおいて、常に有無が容易に判別できたフラグメントをマーカーとした。

採種園クローンの遺伝子型の決定

探索取得したマーカーについて、各クローンの遺伝子型 (Genotype) を決定した。ここでいう、遺伝子型とは、ある遺伝子座における 2 種の対立遺伝子を A, a とした場合の各クローンの接合子の種類、すなわち優性ホモ型 (AA)、ヘテロ型 (Aa)、劣性ホモ型 (aa) のことである。RAPD マーカーは優性マーカーであるため、マーカーが出現しなかったクローンの遺伝子型は劣性ホモ型 (aa) であることが分かる。しかし、マーカーが出現したクローンの遺伝子型は、そのままでは優性ホモ型であるのか、ヘテロ型であるのかを知ることはできない。親の遺伝子型がヘテロ型の場合、マーカーがメンデルの法則に従って雌性配偶体に分離すれば、出現するものと出現しないものの割合は 1 : 1 になる。したがって、10 個の雌性配偶体を調べれば、本来はヘテロ型であるのにもかかわらず優性ホモ型であると判断される確率は 0.02 % 以下となる (Morris and Spieth, 1978)。そこで、そのクローンの雌性配偶体 10 個を分析し、もし 10 個全てにマーカーが出現した場合は優性ホモ型 (AA)、1 つでも出現しないものがあつた場合にはヘテロ型 (Aa) と判断した (Fig 2.4-1)。以上のようにして、取得した全てのマーカーについて、各クローンの遺伝子型を決定した。

人工交配苗の RAPD 分析

決定された各クローンの遺伝子型が正確かどうか検証するために、取得したマーカーを用いて両親の明らかな人工交配苗の分析を行った。供試した人工交配苗は、田辺ーク 54 号を母親とし、津屋崎ーク 50 号、三崎ーク 90 号、志摩ーク 64 号の 3 クローンを花粉親とする 3 組合せ各 8 個体である。マーカー選抜では、母親である田辺ーク 54 号が保有していないマーカーのみを取得したため、分析に用いるマーカーにおける田辺ーク 54 号の遺

Table 2.4-2 Expected phenotypes in the controlled-crosses depending on the male-genotype.

Genotypes of Parents	Expected phenotypes in the controlled-crosses
aa x AA	All, Present
aa x aa	All, Absent
aa x Aa	Some, Present
	The other, Absent

伝子型は全て劣性ホモ型である。人工交配苗における各マーカーの表現型は、花粉親の遺伝子型によって Table 2.4-2 のようになることが期待される。すなわち、花粉親の遺伝子型が優性ホモ型である場合、人工交配苗の全てにフラグメントが出現する。花粉親の遺伝子型が劣性ホモ型である場合、人工交配苗の全てにフラグメントは出現しない。また、花粉親の遺伝子型がヘテロ型である場合、人工交配苗の一部にフラグメントが出現し、残りには出現しない。このような仮説が、実際に成り立っているかどうかについて、取得したマーカーについて、人工交配苗の表現型を検討した。

2. 4. 3 結果

取得したマーカーにおける採種園構成クローンの遺伝子型

スクリーニングの結果、21 個のプライマーを用いた場合に増幅された 28 個のフラグメントが選抜条件を満たしており、花粉親識別のマーカーとして取得できた。この中には、第 2 節・第 3 節で既に取得したマーカーも含まれている。これら 28 個のマーカーのそれぞれについて、各クローンの針葉と雌性配偶体の両方をそれぞれ分析し、採種園を構成する 16 のクローンの遺伝子型をそれぞれ決定した。例えば、U-09(610bp)のマーカーは、土佐清水ーク 63 号と夜須ーク 37 号のどちらの針葉にも出現したため、これらのクローンの遺伝子型が優性ホモ型であるのかヘテロ型であるのかは不明であった。そこで、各クローンの 10 個の雌性配偶体をそれぞれ分析した結果、土佐清水ーク 63 号は 10 個全ての雌性配偶体においてマーカーが出現し、このクローンの遺伝子型が優性ホモ型であることが判明した。一方、夜須ーク 37 号は 10 個中 4 個の雌性配偶体にマーカーが出現し、このクローンの遺伝子型がヘテロ型であることが判明した(Fig 2.4-1)。取得した 28 個のそれぞれのマーカーについて、このように決定した各クローンの遺伝子型を Table 2.4-3 にまとめた。本節では、母親の田辺ーク 54 号が保有していないマーカーを選抜したので、田辺ーク 54 号の遺伝子型は全て劣性ホモ型である。一方、田辺ーク 54 号を除く 15 クローンの遺伝子型は、取得した 28 マーカーのうち、少なくとも 1 つ以上のマーカーが優性ホモ型であった (Table 2.4-3)。

人工交配苗の RAPD 分析

取得した 28 マーカーについて、交配組合せごとの表現型を Table 2.4-4 にまとめた。ここでは、マーカーが出現した個体の合計数を”+”に、出現しなかった個体の合計数を”



Fig 2.4-1 RAPD segregation in haploid megagametophytes from open-pollinated half-sib seed of orchard clones in dominant homozygote and dominant heterozygote.

Lane M : 100bp size marker,
 1-10:haploid megagametophytes from Tosashimizu-(t) 63 (AA),
 11-20:haploid megagametophytes from Yasu-(t) 37 (Aa).
Arrows represent RAPD markers used in this study (U-09, 610bp).

Table 2.4-3 Genotypes of orchard clones deduced by the analyses of the diploid needles and the haploid megagametophytes.

Clone	A-09		A-11		A-12		A-16		A-17		C-06		C-09		D-01		F-01		F-05		F-16		F-19		M-17		I-10		S-10		U-09		V-01		V-04		V-17		X-01		W-14			
	510	490	850	700	620	450	750	520	820	670	810	420	310	710	610	490	490	610	750	800	390	610	400	550	780	470	510	420																
Tanabe-(t)54 ^a	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa		
Namikata-(t)73	Aa	aa	Aa	aa	Aa	Aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	Aa	aa	AA	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa		
Obama-(t)30	AA	aa	aa	aa	aa	AA	aa	aa	Aa	aa	Aa	Aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	Aa	aa	AA	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa		
Tosashimizu-(t)63	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	Aa	aa	Aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	AA	aa	AA	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa		
Ooita-(t)8	Aa	aa	aa	aa	Aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	AA	aa	aa	aa	Aa	aa	AA	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa		
Ei-(t)425	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	AA	aa	Aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa		
Tsuyazaki-(t)50	Aa	aa	aa	Aa	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	Aa	aa	Aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa		
Misaki-(t)90	aa	aa	aa	aa	aa	AA	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	AA	Aa	aa	aa	aa	AA	aa	Aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa		
Ooseto-(t)12	Aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	AA	Aa	aa	aa	Aa	aa	AA	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	
Namikata-(t)37	aa	aa	Aa	aa	Aa	Aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	Aa	aa	aa	aa	Aa	aa	Aa	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	
Yasu-(t)37	aa	aa	aa	aa	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	AA	aa	aa	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	
Shima-(t)64	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	
Yoshida-(t)2	aa	aa	aa	Aa	aa	Aa	aa	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	
Sendai-(t)290	aa	Aa	aa	Aa	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	AA	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	
Mitoyo-(t)103	Aa	aa	aa	aa	aa	AA	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	
Obama-(t)24	Aa	aa	aa	Aa	Aa	Aa	aa	aa	aa	aa	Aa	aa	Aa	aa	AA	aa	aa	aa	Aa	aa	AA	aa	AA	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa

Tanabe-(t)54^a The female parent used for identifying the male parents in this study.

AA: Dominant homozygote, Aa: Dominant heterozygote, aa: Recessive homozygote

ー”に示した。28 マーカーのそれぞれについて、花粉親の遺伝子型と交配苗の表現型を比較して、本研究で決定した花粉親の遺伝子型が正確であるかどうか検討した。例えば A-09(510bp) のフラグメントに着目すると、ヘテロ型である津屋崎ーク 50 号が花粉親の場合、その人工交配苗 8 個体中 5 個体においてフラグメントが出現し、3 個体ではフラグメントが出現しなかった。劣性ホモ型である三崎ーク 90 号が花粉親の場合、その人工交配苗 8 個体全てにおいてフラグメントは出現しなかった。また、優性ホモ型である志摩ーク 64 号が花粉親の場合、その人工交配苗 8 個体全てにフラグメントが出現していた。このように、花粉親の遺伝子型と人工交配苗の表現型は矛盾せず、Table 2.4-2 に示した仮説が 28 マーカー全てにおいて成り立っていることが証明された (Table 2.4-4)。

2. 4. 4 考察

Åkerman ら (1995) は、花粉親が保有せず、種子親候補の片方のクローンだけが保有している 9 個の RAPD マーカーを用いて、European white birch の人工交配苗の分析を行った。そして、それらのマーカーが出現した子供の種子親が、マーカーを保有していた方のクローンであることを明らかにした。このように、種子親あるいは花粉親の候補数が非常に少ない場合には、両親の遺伝子型が不明であっても、その表現型から親を決定することが可能である。子供に出現したマーカーは、どちらかの親に由来するため、どちらもマーカーを保有していない組合せは両親ではないことが分かる (Scott *et al.*, 1992; Åkerman *et al.*, 1995)。この方法では、親の候補間で多型的なマーカーが子供に出現した場合にのみ親候補を絞り込むことができるが、子供にそのマーカーが出現しない場合には、親に関する情報は全く得られないことになる (Scott *et al.*, 1992)。しかし、親候補の遺伝子型が予め決定されていれば、子供にマーカーが出現しない場合でも優性ホモ型であるクローンをその親候補から除くことができる。

あるマーカーにおける母親の遺伝子型が優性ホモ型の場合、花粉親の遺伝子型にかかわらず、子供には必ずそのマーカーが出現する。したがって、花粉親に関する情報は全く得ることができない。母親の遺伝子型がヘテロ型の場合、子供にそのマーカーが出現すれば花粉親の遺伝子型は不明である。しかし、子供にそのマーカーが出現しなければ、優性ホモ型のクローンを花粉親候補から除くことができる。母親の遺伝子型が劣性ホモ型の場合、子供にそのマーカーが出現すれば劣性ホモ型のクローンを、出現しなければ優性ホモ型のクローンを、花粉親候補から除くことができる (Table 2.4-5)。したがって、母親の遺伝子

Table 2.4-4 Segregation of RAPD markers in the progeny of controlled-crosses^a

Primer	Size (bp)	Tsuyazaki-(t)50 ^b			Misaki-(t)90 ^c			Shima-(t)64 ^d		
		Geno- type	Progeny		Geno- type	Progeny		Geno- type	Progeny	
			+	-		+	-		+	-
A-09	510	Aa	5	3	aa	0	8	AA	8	0
A-11	490	aa	0	8	aa	0	8	aa	0	8
	850	aa	0	8	aa	0	8	aa	0	8
A-12	700	Aa	5	3	aa	0	8	aa	0	8
A-16	620	aa	0	8	aa	0	8	aa	0	8
A-17	450	AA	8	0	AA	8	0	aa	0	8
	750	aa	0	8	aa	0	8	aa	0	8
C-06	520	aa	0	8	aa	0	8	aa	0	8
	820	aa	0	8	aa	0	8	aa	0	8
C-09	670	aa	0	8	Aa	6	2	aa	0	8
	810	aa	0	8	aa	0	8	aa	0	8
D-01	420	Aa	5	3	Aa	4	4	Aa	5	3
F-01	310	aa	0	8	aa	0	8	aa	0	8
F-05	710	aa	0	8	AA	8	0	aa	0	8
F-16	610	Aa	3	5	Aa	3	5	Aa	4	4
F-19	490	Aa	4	4	aa	0	8	aa	0	8
M-17	490	aa	0	8	Aa	4	4	aa	0	8
	610	aa	0	8	aa	0	8	aa	0	8
I-10	750	Aa	5	3	AA	8	0	Aa	3	5
	800	Aa	2	6	aa	0	8	aa	0	8
S-10	390	aa	0	8	Aa	3	5	aa	0	8
U-09	610	aa	0	8	aa	0	8	aa	0	8
V-01	400	Aa	6	2	Aa	6	2	Aa	3	5
V-04	550	aa	0	8	Aa	2	6	aa	0	8
	780	aa	0	8	aa	0	8	aa	0	8
V-17	470	Aa	3	5	aa	0	8	Aa	5	3
X-01	510	Aa	4	4	aa	0	8	aa	0	8
W-14	420	Aa	3	5	Aa	4	4	aa	0	8

controlled-crosses^a : The common female parent of three different crosses is Tanabe-(t)54.

Tsuyazaki-(t)50^b, Misaki-(t)90^c, Shima-(t)64^d: These clones were used as the male parents of the controlled-crosses.

**Table 2.4-5 Comparison of male-genotype information
among genotypes of female-parent.**

Genotypes of female-parent	Phenotype in the progeny	Genotypes of male-parents, which can be excluded.
AA	+	No information
Aa	+	No information
	—	AA
aa	+	aa
	—	AA

型が劣性ホモ型であるマーカーが、花粉親分析に最も有効であると考えられる。本研究では、母親の田辺ーク 54 号が劣性ホモ型である 28 個のマーカーを取得できたため、花粉親に関する多くの情報を得ることができる。また、田辺ーク 54 号による自殖が発生した場合、遺伝子型の組合せは劣性ホモ型×劣性ホモ型となるため、28 個のマーカー全ては自殖種子には出現しないはずである。一方、28 個のマーカーのうち、田辺ーク 54 号を除く 15 クローンの遺伝子型は、少なくとも 1 つは優性ホモ型であるため (Table 2.4-3)、28 個のマーカー全てが出現しなかったものは自殖であると考えられる。

取得した RAPD マーカーについて、各個体の遺伝子型を決定するには半数体が必要である。針葉樹の雌性配偶体は半数体であるが、その雌性配偶体を利用するには、目的とする個体が既に成熟しており、その個体から種子が得られなければならない。この点で、針葉樹の採種園は、構成個体の遺伝子型を決定するのに非常に都合がよいといえる。しかし、Lu ら(1995)は Scots pine において、10 個の雌性配偶体の分析によって推定した親の遺伝子型と人工交配苗の結果にいくつかの不一致が認められたとしている。したがって、本格的な研究を始める前に、雌性配偶体の分析によって決定した遺伝子型の正確性を検討しておく必要があると考えられる。本研究では、針葉と 10 個の雌性配偶体を用いて各クローンの遺伝子型を決定し、決定された遺伝子型が正確であるかどうかを人工交配苗の分析によって検証した。その結果、花粉親の遺伝子型と人工交配苗の表現型は矛盾せず、決定された遺伝子型が正確であることが確かめられた。したがって、本研究で得られた 28 個のマーカーは、田辺ーク 54 号種子の花粉親識別に有効であると考えられた。

第5節 結論

本章では、採種園の遺伝子管理を行うために、RAPD マーカーを用いたクローン識別法と採種園産種苗の花粉親識別法の開発を行った。

第2節では、RAPD マーカーの表現型によるクローン識別法を開発した。マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成する 16 クローンは、我が国の西日本地域という限定された地域から選抜されているにもかかわらず、RAPD マーカーはクローン間で十分な変異を示した。そして、5回の PCR 反応による再現性テストを実施することにより、再現性の高い 10 個のマーカーを取得することができた。これら 10 個のマーカーについて、採種園構成クローンの表現型を比較した結果、表現型は各クローンに固有であり、互いに識別することができた。10 個のマーカーの表現型は、異なる生育環境におかれた同一クローンの個体間で同一であり、また、異なる研究機関における分析でも同一であった。遺伝的に異なる不正規な個体と採種園構成クローンの表現型が偶然に一致する確率を算定した結果、16 クローン平均で約 110 分の 1 となり、クローン間の取り違いだけではなく、台木の立ち上がり等の不正規な個体の混入をも検出できることが示された。

第3節では、第2節で開発したクローン識別法を簡便化するために、複数の個体を混合したサンプルを用いて一度に DNA 抽出と RAPD 分析を行うバルク法を開発した。2つのクローンの針葉をそれぞれ 150mg と 50mg 混合した 6 種類の混合サンプルを調製し、用いた 2 クローンと混合サンプルの表現型を比較した。20 個のマーカーのうち、18 個のマーカーは 50mg 混合したクローンのみが保有したマーカーが混合サンプルに出現したが、2 個のマーカーはそのマーカーが出現しなかった。したがって、個別に分析する場合には有効でも、バルク法では適用できないマーカーがあることが明らかとなり、本格的な実験を行う前に、各マーカーの検出能力を検討しておく必要があると考えられた。18 個のマーカーにおける 6 種類の混合サンプルの表現型は、単一クローンの表現型とはそれぞれ異なっていた。したがって、遺伝的に異なる個体が全体の 4 分の 1 の量混入した場合、その存在を検出できることが示された。すなわち、植栽位置図で同一クローンと記載された 4 個体の針葉を等量混合したサンプルを調製して DNA 抽出と RAPD 分析を行い、混合サンプルと基準個体の表現型を比較することにより、供試した 4 個体の中に不正規な個体が存在するかどうかを確認できることが明らかとなった。この方法を用いることにより、採種園構成個体の遺伝子管理を効率的に行うことができると考えられた。

第4節では、RAPD マーカーを用いた採種園産種苗の花粉親識別法を開発した。種子生産性の最も高い田辺ーク 54 号を母親クローンとして選択し、このクローンの自然交配実生苗の花粉親を識別するために有効なマーカーを探索した。その結果、田辺ーク 54 号が保有せず、他の 15 クローン間で多型的な 28 個のマーカーを取得できた。これら 28 個のマーカーについて、採種園構成クローンの針葉と各 10 個の雌性配偶体を用いて、各クローンの遺伝子型を決定した。決定した遺伝子型の正確性を検討するために、田辺ーク 54 号を母親とする 3 交配組合せの人工交配苗の分析を行った。28 個のマーカーについて調査した結果、全ての組合せにおいて、花粉親の遺伝子型と人工交配苗の表現型は矛盾しなかった。以上のことから、田辺ーク 54 号の自然交配実生苗の表現型と採種園構成クローンの遺伝子型とを比較することにより、各実生苗の花粉親を識別できる可能性が示された。

第3章 遺伝子管理技術の適用による採種園の実態解明

第1節 序

第2章では、採種園における遺伝子管理を行うために、有効な RAPD マーカーの探索とそのマーカーを用いた、クローン識別法および採種園産種苗の花粉親識別法の開発を行った。本章では、第2章で開発したこれらの遺伝子管理技術を実際の採種園に適用し、その有効性を検証するとともに、採種園におけるクローン管理および交配の実態を明らかにすることを目的とした。

本章第2節では、第2章第2節で開発したクローン識別法を鹿児島県採種園に適用し、クローン管理の実態を明らかにした。また、得られた結果から、人為的なミスが発生する要因を考察した。

本章第3節では、第2章第3節で開発したクローン識別の簡便化法（バルク法）を福岡県採種園に適用し、クローン管理の実態を明らかにした。また、得られた結果から、バルク法の効率性について考察を行った。

本章第4節では、第2章第4節で開発した採種園産種苗の花粉親識別法を福岡県採種園に適用し、自然交配実生苗における花粉汚染、自殖、各クローンの花粉親としての寄与など、採種園における交配実態を明らかにした。また、得られた結果から、採種園の交配様式に影響を与える要因について考察した。

第2節 鹿児島県採種園におけるクローン管理の実態

3. 2. 1 はじめに

鹿児島県のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園（以下、鹿児島県採種園とする）は、マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業で選抜されたクロマツ (*Pinus thunbergii*) 16 クローン（藤本ら，1989）の接ぎ木苗 400 個体を用いて、1987～1988 年に鹿児島県始良郡隼人町に造成された。近年、この採種園から、事業的な規模で抵抗性種苗の生産がなされるようになっている。採種園は、作業道を挟んで北側と南側の区域に分けられる。このうち南側区域では、植栽位置図には同一クローンとして記載されているにもかかわらず、種子の形態が明らかに異なる個体が存在していることが観察されている。また、採種園構成クローンの一つである小浜ーク 24 号は他のクローンと視覚的に区別することができるが、このクローンも植栽位置図に記載されている場所と実際の配置が異なっていることが観察されている（川内，私信）。したがって、この区域ではラベルミスや植栽ミスなどの人為的ミスが発生し、植栽位置図と採種園における現実のクローン配置が異なっていることが予想され、早急に構成個体の遺伝子管理を行う必要がある。

そこで本節では、第2章第2節で開発したクローン識別技術を用いて、南側区域におけるクローン管理の実態を解明することを試みた。

3. 2. 2 材料と方法

鹿児島県採種園のクローン配置はギルティッヒ法（Giertych, 1965）によって設計され、同一クローンのラメートができるだけ離れるように規則的に配置されている。この採種園では、各クローンの割付番号が記載された植栽位置図を用いて、各個体のクローン管理を行っている。枯損が生じた場合、植栽位置図の割付番号をもとに、基本的には枯損したものと同一クローンを補植している。しかし、枯損したクローンの苗木が調達できなかった場合は、同一クローンが隣り合わないよう考慮した上で他のクローンに改植し、その都度、植栽位置図の改訂を行ってきた。

本研究で用いた供試材料は、採種園南側区域に植栽された全ての個体で、採種園造成当時に植栽された 145 個体と枯損した箇所に補植された 41 個体の合計 186 個体である。各個体からは針葉約 150mg を採取し、分析に供するまでチャック付きのポリ袋に入れて－20℃のフリーザーで保存した。なお、サンプリングを行う際には、採取する個体にラベルを

付けるとともにサンプリング袋にはラベルの番号を付記し、分析した個体を後で確認できるようにした。DNA 抽出および RAPD 分析の方法は、第 2 章第 2 節と同様である。

3. 2. 3 結果

第 2 章第 2 節で開発した 10 個のマーカーを用いて分析した結果、鹿児島県採種園の南側区域に存在した 186 個体のうち、37 個体 (19.9 %) が植栽位置図に記載されていたクローンとは異なる表現型を示した。RAPD 分析によって判明したクローンの配置を Fig 3.2-1 に示す。これらの 37 個体のうち、21 個体 (56.8 %) は、RAPD 分析によって判明したクローンの割付番号が植栽位置図において縦もしくは横に一字ずれた位置に記載されていたクローンの割付番号と一致していた。また、採種園には非常に紛らわしい名前を持つ 2 つのクローン、波方ーク 73 号 (割付番号 10) と波方ーク 37 号 (割付番号 3) が存在するが、これらを取り違えたと考えられるものが 4 個体認められた。また、表現型が採種園構成クローンのいずれとも一致しないものが 3 個体認められ、これら 3 個体の表現型はそれぞれ互いに異なっていた。植栽位置図と RAPD 分析の結果が異なっていた 37 個体を植栽年度によって分類し、ミス発生割合をそれぞれ求めた結果、造成当時から植栽されていたものが 145 個体中 26 個体 (17.9 %)、補植苗が 41 個体中 11 個体 (26.8 %) であった (Table 3.2-1)。

3. 2. 4 考察

植栽位置図と RAPD 分析の結果が一致しなかった個体は、採種園を造成・管理していく過程でラベルミスや植栽ミスが発生し、植栽位置図と異なるクローンが配置されたものと考えられる。採種園におけるこのようなミスは、世界共通して発生する問題である (Wheeler and Jech, 1992)。Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) の採種園では 9 ブロック中 5 ブロックでラベルミスが発生し、その割合は 2 ~ 13 % であったと報告されている (Adams, 1983)。この他にも、Scots pine (*Pinus sylvestris*) の採種園では 7 ~ 10 % (Harju and Muona, 1989)、Loblolly pine (*Pinus taeda*) の採種園では約 10 % (Wheeler and Jech, 1992) の個体が、ラベルミスなどによって誤って植栽されていることが確認されている。本研究は、我が国の採種園におけるクローン管理の実態を初めて明らかにしたものであるが、調査した個体の約 2 割に何らかの人為的ミスが発生していることが明らかとなり、採種園構成個体の遺伝子管理の重要性が示された。

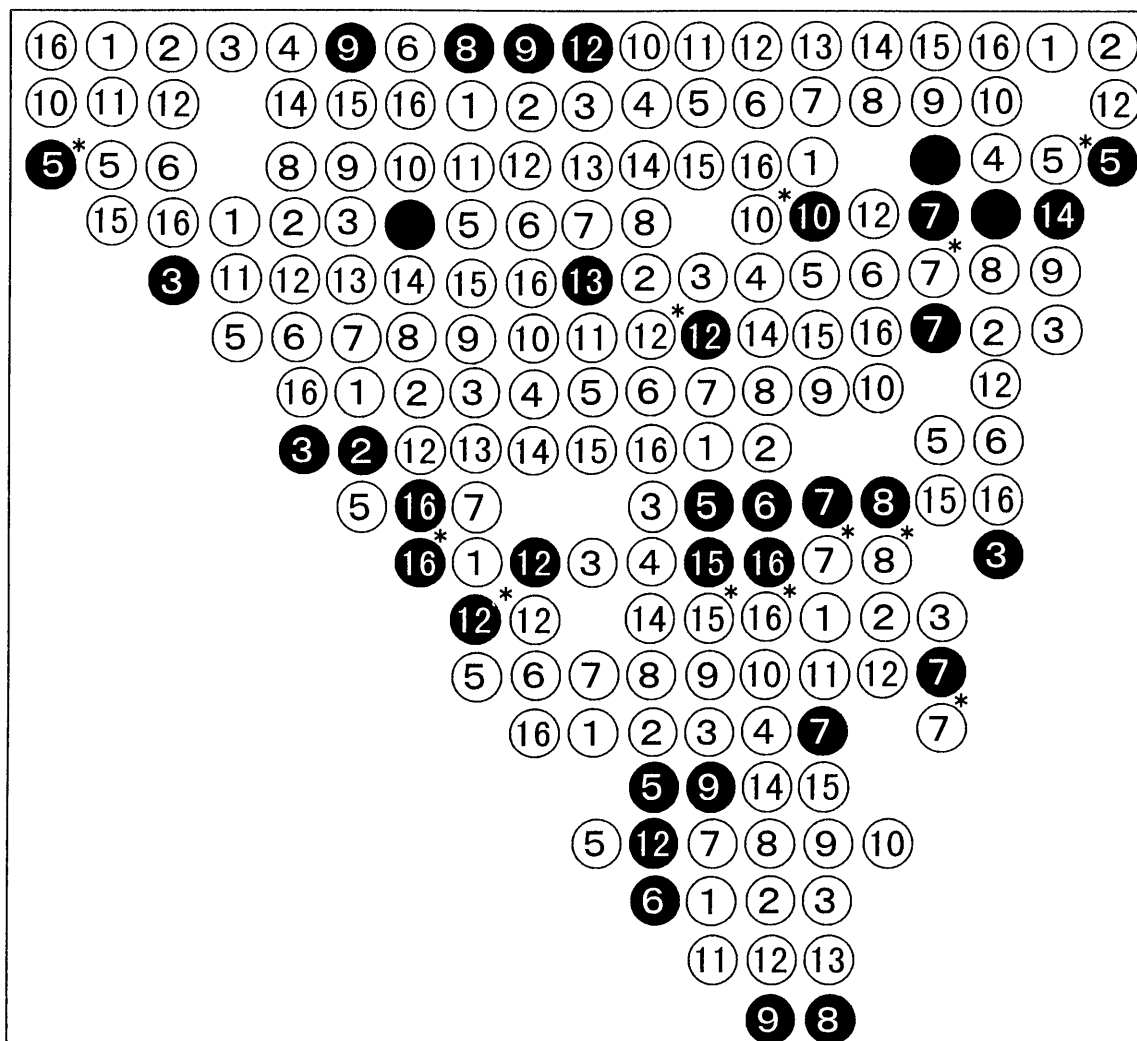


Fig 3.2-1 Clone location in the south area of Kagoshima Pref. seed orchard identified by RAPD analysis.

①Mitoyo-(t)103 ②Sendai-(t)290 ③Namikata-(t)37 ④Ooseto-(t)12 ⑤Yoshida-(t)2 ⑥Ei-(t)425
 ⑦Tsuyazaki-(t)50 ⑧Obama-(t)24 ⑨Obama-(t)30 ⑩Namikata-(t)73 ⑪Tosashimizu-(t)63 ⑫Ooita-(t)8
 ⑬Yasu-(t)37 ⑭Tanabe-(t)54 ⑮Shima-(t)64 ⑯Misaki-(t)90

Empty number : individuals that clone identified by RAPD analysis was consistent with planting map.

Filled number : Individuals that clone identified by RAPD analysis was inconsistent with planting map.

● : Individuals that RAPD patterns were inconsistent with any orchard clones.

○* : Individuals that same clones were planted nearest each other.

**Table 3.2-1 Classification depending on causes of inconsistency
between planting map and RAPD analysis.**

Planting period	Number of Individuals	Discrepancy of rows ^{*1}	Clone name ^{*2}	Root- stocks ^{*3}	Unknown	Total
Establishment	145	16 (61.5)	2 (7.7)	0 (0)	8 (30.8)	26 (17.9) ^{*4}
Supplement	41	5 (45.4)	2 (18.2)	3 (27.3)	1 (9.1)	11 (26.8) ^{*4}
Total	186	21 (56.8)	4 (10.8)	3 (8.1)	9 (24.3)	37 (19.9) ^{*4}

Discrepancy of rows^{*1}: Clone identified by RAPD analysis was consistent with clone noted in in planting map.neighbour rows

Clone name^{*2}: Clone names resembles each other.

Rootstocks^{*3}: Rootstocks considered to be overtaken the grafts.

()^{*4}: Proportion of missed individuals per investigated individuals.

本採種園でミスが発生した個体の半数以上は、縦もしくは横の列が一例ずれて植栽されており、列の読み間違いによるものと考えられた。このような列の間違いが多発した原因としては、この区域の形が方形ではなく三角であるため、三角形の一辺と採種園の縦および横のラインを混同しやすいためであると考えられる。また、造成当時に植栽された個体と補植苗のミス発生率を比較すると、補植苗の方がより発生率が高いことが明らかとなった。この採種園では立て札を使用しておらず、植栽位置図を基準として補植を行っている。もし、立て札を設置していれば、その立て札を基準に補植位置の確認ができるため、補植苗の植栽ミスは防止できた可能性もある。

我が国で選抜される精英樹は、地域名の後に通し番号を付けていることが多い（林木育種センター，1999）。採種園では、これらの精英樹の名前がそのまま用いられるのが一般的である。しかし、本研究の結果から、採種園構成クローンの中に非常に紛らわしい名前を持つものがあると、それらを互いに取り違える危険性があることが示された。したがって、同じ採種園を構成するクローンの中に非常によく似た名前を持つものが存在する場合には、どちらかの名称を変えるなどの措置を取る必要があると考えられる。

また、表現型が採種園構成クローンのいずれとも一致しなかったものが3個体検出された。これら3個体の表現型は互いに異なっていたため、台木の立ち上がりであることが推察された。採種園においてこれら3個体を観察した結果、接ぎ穂部分が枯損し、台木が立ち上がっている様子が観察された。したがって、各クローンのラメートを接ぎ木によって増殖する場合、接ぎ木後の保育管理をこまめに行い（中平・染郷，1973）、台木の立ち上がりを慎重に防ぐ必要があることが明らかとなった。

このようなミスにより、南側区域では12箇所で同一クローンが隣り合って配置されていることが明らかとなった（Fig. 3.2-1）。同一クローンが隣り合って配置された場合、自家受粉の起こる機会が多くなると考えられる。クロマツの自家受粉では、他家受粉と比べて、球果数や充実種子数が減少することが知られている（勝田，1964；渡辺・岩川，1969）。本採種園におけるその後の調査でも、これらの同一クローンが隣り合って配置されている箇所では、他の箇所に比べて極端に充実種子数が減少することが観察されている（川内，私信）。また、戸田（1997）は、マツノザイセンチュウ抵抗性クローンの自殖苗と他殖苗にマツノザイセンチュウの接種試験を行った結果、自殖苗の接種生存率が他殖苗の半分程度に低下したとしている。したがって、採種園産種苗の生産性や遺伝的品質の低下などを避けるために、これらの箇所については早急に適切なクローンに改植する必要がある。

以上のように、本研究で開発した RAPD マーカの表現型によるクローン識別法は、実際の採種園を構成する個体の遺伝子管理に有効な手段であることが明らかとなった。

第3節 福岡県採種園におけるクローン管理の実態

3. 3. 1 はじめに

本章の第2節では、第2章第2節で開発したクローン識別法を鹿児島県採種園に適用し、そのクローン管理の実態を明らかにすることができた。しかし、この方法では、採種園を構成する全ての個体から、個別にDNAを抽出し、RAPD分析を行う必要がある。そこで、第2章第3節では、バルク法 (Michelmore *et al.*, 1991; Yu and Pauls, 1993) を利用して、複数の個体の針葉を混合したサンプルを調製し、複数個体のクローンの正確性を一度に検定できるクローン識別の簡便化法の開発を行った。本節では、この方法を福岡県採種園に適用し、そのクローン管理実態を明らかにすることを試みた。

3. 3. 2 材料と方法

採種園の概要

福岡県のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園 (以下、福岡県採種園とする) は、マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業で選抜されたクロマツ (*Pinus thunbergii*) 16 クローン (藤本ら, 1989) の接ぎ木苗 200 個体を用いて、1985 年に福岡県小郡市に造成された。採種園のクローン配置はギルティッヒ法 (Giertych, 1965) によって設計され、同一クローンのラメートができるだけ離れるように規則的に配置されている。個体の立木間隔は 5 × 5 m で、採種園の面積は 0.5ha である。この採種園では、クローン名と各クローンの割付番号を記載した植栽位置図と、同様の記載をしたアルミ製の立て札を用いて、構成個体のクローン管理を行ってきた。枯損が生じた場合には、植栽位置図と立て札を基準に、できるかぎり速やかに同一クローンの接ぎ木苗を補植している。枯損したクローンの苗木が調達できなかった場合には、苗木の調達ができるまで植栽せずに欠番にしている。

供試材料

第2章第2節、第3節では、本採種園に南側最前列に植栽された配置された各クローンの1個体をそのクローンの基準個体として用いている。これらの個体は、福岡県森林林業技術センターにクローン集植された個体と比較することによって、クローンの正確性が既に確認されている (第2章第2節)。本節でも、これらの個体を各クローンの基準個体として用いた (Fig 3.3-1)。本節では、植栽位置図と立て札に記載されたクローン名に従っ

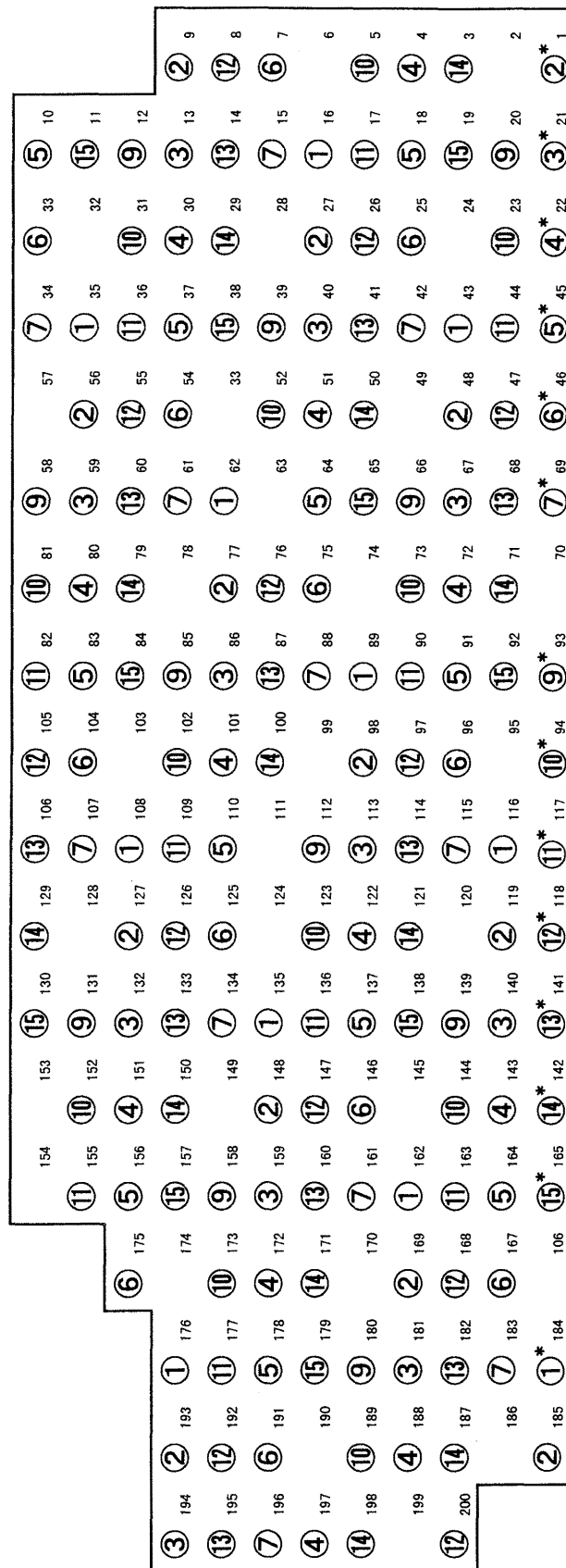


Fig 3.3-1 Clonal layouts and individual number of the investigated plants.

- ① Namikata-(t)73, ② Obama-(t)30, ③ Tosashimizu-(t)63, ④ Ooita-(t)8, ⑤ Ei-(t)425, ⑥ Tsuyazaki-(t)50, ⑦ Misaki-(t)90, ⑧ Namikata-(t)37, ⑩ Tanabe-(t)54, ⑪ Yasu-(t)37, ⑫ Shima-(t)64, ⑬ Yoshida-(t)2, ⑭ Sendai-(t)290, ⑮ Mitoyo-(t)103

No.1-200 noted besides the clone number is the individual number of each plant.

O* : Standard plants of each clone used for the study.

て、大瀬戸ーク 12 号と小浜ーク 24 号を除いた 14 クローン合計 157 個体から針葉を個別に採取し、それをチャック付きのポリ袋に入れた。採種園の個体には、造成当時の配置に従って 1 ～ 200 番までの通し番号（個体番号）がつけられている（Fig 3.3-1）。そこで、針葉サンプルを入れたポリ袋には、植栽位置図と立て札に記載されたクローン名と個体番号を記録した。

混合サンプルの調製

各個体から個別に収集した針葉は、サンプル袋に記録されたクローン名ごとに分類した。そして、同じクローン名が付記された個体の針葉をそれぞれ 50mg ずつ量り取り、最大 4 個体を等量混合した。本節では、各クローンについて Bulk A, B, C の 3 種類、14 クローン合計で 42 種類の混合サンプルを調整した（Table 3.3-1）。混合サンプルからの DNA 抽出および RAPD 分析の方法は、第 2 章第 3 節の通りである。なお、本節では、第 2 章第 3 節で有効性を確かめた 18 個のマーカーの中から、12 プライマーを用いた場合に増幅される 15 個のマーカーを用いた。

不正規個体の決定

15 個のマーカーにおける表現型が基準個体と異なる混合サンプルの中には、本来その位置に植栽されるべきクローンとは遺伝的に異なる不正規な個体が混入していると考えられる。バルク分析では、この不正規個体の存在を検出することはできるが、混合サンプルを構成する個体のうち、どの個体が不正規個体であるのかを決定することはできない。そこで、基準個体と異なる表現型を示した混合サンプルについて、混合サンプルを構成した個体から個別に DNA を抽出し、第 2 章第 2 節の方法でクローン識別を行った。

3. 3. 3 結果

供試した 15 個のマーカーについて、各クローンの基準個体と混合サンプルの表現型を Table 3.3-2 に示す。42 種類の混合サンプルのうち、波方ーク 73 号の Bulk B、波方ーク 37 号の Bulk B、志摩ーク 64 号の Bulk A の 3 種類の混合サンプルの表現型は、基準個体とは異なっていた。異なる表現型を示したマーカーの数は、波方ーク 73 号の B が 3 個、波方ーク 37 号の B が 3 個、志摩ーク 64 号の A が 4 個であった。これら 3 種類の混合サンプルについて、構成個体から個別に DNA を抽出し、第 2 章第 2 節の方法でクローン識別

Table 3.3-1 Contents of the bulked samples.

Clone	No. of plants	Bulked samples and contents ^a
Namikata-(t)73	10	A (16, 43, 35, 62) B (89, 108, 116, 135) C (162, 176)
Obama-(t)30	12	A (9, 27, 48, 56) B (77, 98, 119, 127) C (148, 169, 185, 193)
Tosashimizu-(t)63	11	A (13, 40, 59, 67) B (86, 113, 132, 140) C (159, 181, 194)
Ooita-(t)8	12	A (4, 30, 51, 72) B (80, 101, 122, 143) C (151, 172, 188, 197)
Ei-(t)425	11	A (10, 18, 37, 64) B (83, 91, 110, 137) C (156, 164, 178)
Tsuyazaki-(t)50	12	A (7, 25, 33, 54) B (75, 96, 104, 125) C (146, 167, 175, 191)
Misaki-(t)90	11	A (15, 34, 42, 61) B (88, 107, 115, 134) C (161, 183, 196)
Namikata-(t)37	11	A (12, 20, 39, 66) B (58, 85, 112, 139) C (131, 158, 180)
Tanabe-(t)54	12	A (5, 23, 31, 52) B (73, 81, 102, 123) C (144, 152, 173, 189)
Yasu-(t)37	10	A (17, 36, 44, 90) B (82, 109, 136, 163) C (155, 177)
Shima-(t)64	12	A (8, 26, 47, 55) B (76, 97, 105, 126) C (147, 168, 192, 200)
Yoshida-(t)2	11	A (14, 41, 60, 68) B (87, 106, 114, 133) C (160, 182, 195)
Sendai-(t)290	12	A (3, 29, 50, 71) B (79, 100, 121, 129) C (150, 171, 187, 198)
Mitoyo-(t)103	10	A (11, 19, 38, 65) B (84, 92, 130, 138) C (157, 179)
Total	157	

Contents^a: Individual No. consisted of bulked samples.

Table 3.3-2 RAPD phenotypes of orchard clones and bulked samples.

Primer	bp	Namikata-(t)73	Obama-(t)30	Tosashimizu-(t)63	Ooita-(t)8	Ei-(t)425	Tsuyazaki-(t)50	Misaki-(t)90
A-09	510							Bulk C
A-17	750							Bulk B
D-03	700							Bulk A
	800							Standarad
F-03	720							Bulk C
F-05	710							Bulk B
F-16	610							Bulk A
G-17	590							Standarad
I-10	530							Bulk C
	750							Bulk B
	800							Bulk A
S-18	700							Standarad
U-03	700							Bulk C
U-09	610							Bulk B
V-17	470							Bulk A
								Standarad

+* : Polymorphic fragments detected in the bulked samples.

Table 3.3-2 (Continued)

Primer	bp	Namikata-(t)37	Tanabe-(t)54	Yasu-(t)37	Shima-(t)64	Yoshida-(t)2	Sendai-(t)290	Mitoyo-(t)103
		Bulk C	Bulk C	Bulk C	Bulk C	Bulk C	Bulk C	Bulk C
A-09	510	+	+	+	+	+	+	+
A-17	750	+	+	+	+	+	+	+
D-03	700	+	+	+	+	+	+	+
	800	+	+	+	+	+	+	+
F-03	720	+	+	+	+	+	+	+
F-05	710	+	+	+	+	+	+	+
F-16	610	+	+	+	+	+	+	+
G-17	590	+	+	+	+	+	+	+
I-10	530	+	+	+	+	+	+	+
	750	+	+	+	+	+	+	+
	800	+	+	+	+	+	+	+
S-18	700	-	+	+	+	+	+	+
U-03	700	-	+	+	+	+	+	+
U-09	610	-	+	+	+	+	+	+
V-17	470	-	-	-	-	-	-	-
		Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard

* : Polymorphic fragments detected in bulked samples.

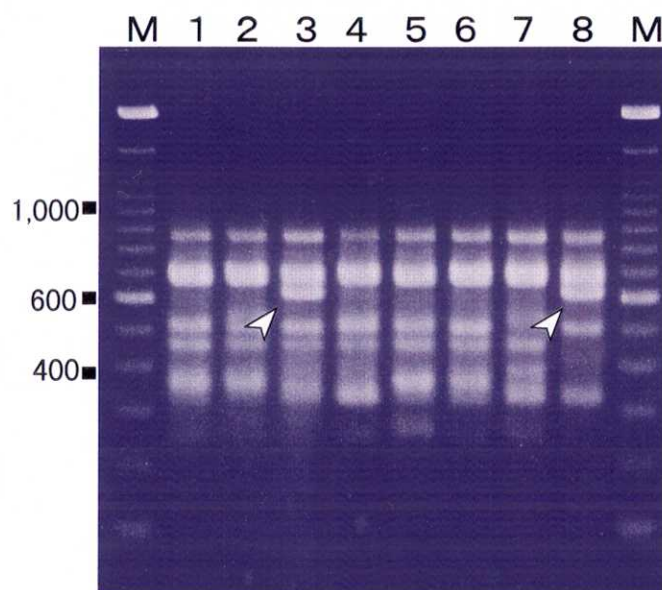
を行った (Fig 3.3-2)。その結果、波方ーク 73 号の Bulk B を構成する個体 No.89, 108, 116 の 3 個体、波方ーク 37 号の Bulk B を構成する個体 No.58, 85, 112 の 3 個体、志摩ーク 64 号の Bulk A を構成する個体 No.26, 47, 55 の 3 個体の表現型は、それぞれのクローンの基準個体と一致しており、これらの 9 個体が採種園に正しく配置されていたことが明らかとなった。一方、波方ーク 73 号の個体 No.135 の表現型は、土佐清水ーク 63 号と一致した。また、波方ーク 37 号の個体 No.139 と志摩ーク 64 号の個体 No.8 の表現型は、採種園構成クローンのいずれとも一致せず、しかも互いに異なっていた。

3. 3. 4 考察

本節では、採種園の植栽位置図と立て札に記載された 14 クローンについて各 3 種類、合計 42 種類の混合サンプルを調製し、15 個のマーカールについて基準個体と混合サンプルの表現型を比較した。その結果、3 種類の混合サンプルの表現型が基準個体と異なっており、その中に不正規個体が存在していることが示された。そこで、これら 3 種類の混合サンプルを構成する合計 12 個体から個別に DNA を抽出し、不正規個体の決定を行った。したがって、一連の作業としては、 $42 + 12 = 54$ サンプル分の実験量で、157 個体のクローン識別を行うことができた。つまり、実験量は、個別に DNA を抽出し、RAPD 分析する場合の約 3 分の 1 程度に省略できたことになる。ミス発生率によってその効率性は異なるが、5 % 程度までの発生率であれば、バルク法を用いた方が効率的であると考えられる。

本研究で開発したバルク法では、表現型が基準個体と一致した混合サンプル中に、本当に不正規個体が存在しないことを確認しておく必要がある。宮原ら (印刷中) は、本研究で基準個体と一致した 39 種類の混合サンプルを構成する全ての個体から個別に DNA を抽出し、第 2 章第 2 節の方法でクローン識別を行った。その結果、39 種類の混合サンプルを構成する各個体の表現型はそれぞれの基準個体と一致しており、それぞれの個体が採種園に正しく配置されていることが明らかとなった。

福岡県採種園では、157 個体中 3 個体 (1.9 %) が本来植栽されるべきクローンと異なっており、ラベルミスや植栽ミスが発生していることが示された。前述したように、海外では、Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) の採種園、Scots pine (*Pinus sylvestris*) の採種園、Loblolly pine (*Pinus taeda*) の採種園などにおいて、2 ~ 13 % のラベルミスの発生が報告されている (Adams, 1983; Harju and Muona, 1989; Wheeler and Jech, 1992)。本採種園におけるミス発生率は、これらの報告に比べて、同程度かやや低い値であった。本採種園は、管



U-09

Fig 3.3-2 Detection of contaminants from ramets within same clone using RAPD analysis with bulking procedure.

This electrophoretic profiles show a part of PCR products using RAPD primer U-09. Lane M: 100bp size marker (Gibco BRL),
 1: Namikata-(t)37, 2: Bulk A (No.12, 20, 39, 66),
 3: Bulk B (No.58, 85, 112, 139), 4: Bulk C (No. 131, 158, 180),
 5: No.58, 6: No.85, 7: No.112, 8: No.139
Arrows represent RAPD markers used in this study.

轄主体から比較的近く、交通の便がよいところに位置している。したがって、こまめに管理が行えたことが、ミス発生率の低さにつながったと考えられる。また、本採種園では、植栽位置図とアルミ製の立て札の併用によるクローン管理を行ってきた。木製の立て札は下刈り時などに破損することもあるため、多少高価ではあるが、アルミ製の立て札を用いることで補植時の植栽ミスなどを防止できると考えられる。

Keil and Griffin(1994)は、事業的に販売されている *Eucalyptus* の優良クローンの中に、クローン名が標示とは異なるものがあることを RAPD 分析によって確かめている。そして、Keil and Griffin(1994)は、採種園を構成する個体におけるラベルミス以上に、採穂母樹自体のミスは重大だとしている。今回の結果から、土佐清水ーク 63 号であることが判明した個体 No.135 は補植苗であり、ラベルには波方ーク 73 号と記載されていた。本採種園の補植苗は、福岡県森林林業技術センター内に定植した各クローン数個体を採穂母樹として接ぎ木増殖されている。今のところ、今回のミスが、接ぎ木時や床替え時のラベルミスであるのか、それとも採穂母樹自体のミスであるのかは不明であるが、これらの採穂母樹についても早急にクローン識別を行う必要がある。

本採種園では、採種園構成クローン以外の不正規な個体が 2 個体存在していることが明らかとなった。これらの個体は既に成木となっており、接ぎ木の台木が立ち上がったものであるかどうかは不明であった。これらの 2 個体は、既に十分な量の花粉や球果を付けており、採種園産種子に遺伝的な影響を与えていることが予想された。このように、園内に採種園構成クローン以外の不正規な個体が成木として存在すると、母親としてだけでなく花粉親としても採種園産種子の遺伝的品質を低下させるため、採種園の遺伝的効果を著しく減退させる危険性がある。Van de Ven and McNicol(1995)は、Sitka spruce(*Picea sitchensis*) 採種園を構成する 5 クローンのラメートそれぞれ 5 個体を RAPD 分析し、そのうち 1 クローンのラメートの中に採種園構成クローン以外の個体が混入していたとした。そして、Van de Ven and McNicol(1995)は、構成個体のクローン正確性の検討は、個体の移植が容易な造成初期に行うのが望ましいと述べている。本研究の結果からも、採種園構成個体の遺伝子管理はできるだけ早期に、少なくとも構成個体が成熟する前に実施した方がよいことが示された。

以上のように、バルク法を利用したクローン識別の簡便化法は、実際の採種園においても有効であった。この方法を利用することにより、採種園構成個体の遺伝子管理を効率的に行うことができると考えられる。

第4節 福岡県採種園における交配実態

3. 4. 1 はじめに

第2章第4節では、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園の中で最も種子生産性の高い田辺ーク 54 号（後藤・宮原, 2000）の自然交配実生苗の花粉親を識別するために、有効な RAPD マーカーを開発し、雌性配偶体の分析により採種園を構成する 16 クロンの遺伝子型を明らかにした。本節では、これらのマーカーを用いて、福岡県小郡市のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園（以下、福岡県採種園とする）から産出された田辺ーク 54 号の自然交配実生苗の花粉親を識別し、採種園における交配実態を明らかにすることを目的とした。

3. 4. 2 材料と方法

供試材料

供試材料は、福岡県採種園から産出された田辺ーク 54 号の自然交配実生苗 85 個体である。これらの実生苗は、1997 年 10 月に福岡県採種園の田辺ーク 54 号の 1 個体から球果を採取し、1998 年 4 月に福岡県森林林業技術センター苗畑に播種したものである。そして、1999 年 3 月に床替えした後、1999 年 6 月に各個体から針葉約 150mg を採取して花粉親識別の材料として用いた。なお、針葉からの DNA 抽出および RAPD 分析の方法は、第2章第2節と同様である。

花粉親の識別

第2章第4節で採種園構成クロンの遺伝子型を明らかにした 28 個のマーカーを用いて、実生苗 85 個体の RAPD 分析を行った。取得した 28 個のマーカーにおける田辺ーク 54 号の遺伝子型は全て劣性ホモ型であるため、田辺ーク 54 号の実生苗に出現したマーカーは全て花粉親に由来していると考えられる。したがって、そのマーカーにおける花粉親の遺伝子型は優性ホモ型もしくはヘテロ型であり、遺伝子型が劣性ホモ型のクロンを花粉親の候補から除外できる。一方、田辺ーク 54 号の実生苗にマーカーが出現しなかった場合、そのマーカーにおける遺伝子型が優性ホモ型のクロンを花粉親の候補から除外できる。

このように実生苗の表現型と採種園構成クロンの遺伝子型とを比較することにより、各実生苗の花粉親を絞り込むことができる。花粉親の識別方法について、Fig 3.4-1 のモデ

ル例を用いて、詳説する。ここでは単純化のために、採種園構成クローンが母親と他の2クローン (A, B) の合計3クローンであると仮定する。まず、プライマー#1のマーカースに着目すると、このマーカースは実生苗 No.1, 2, 3, 5の4個体に出現している。したがって、これらの4個体は自殖ではなく、A か B が花粉親であることが分かる。一方、実生苗 No.4にはこのマーカースが出現していないので、この個体の花粉親は優性ホモ型のAではなく、自殖かBであることが分かる。次に、プライマー#2のマーカースに着目すると、このマーカースは実生苗 No.2と5に出現しているので、これらの花粉親がやはりAかBであることが分かる。しかし、実生苗 No.2と5は、プライマー#1のマーカースによる情報で、既に花粉親がAかBのどちらかであることは分かっているので、このプライマー#2のマーカースでは新しい情報が得られなかったことになる。一方、このマーカースは実生苗 No.1, 3, 4には出現しなかったので、これらの実生苗の花粉親は優性ホモ型のBではなく、それぞれA, A, 自殖であることが分かる。さらに、プライマー#3のマーカースに着目すると、このマーカースは実生苗 No.2, 3, 5に出現している。ここで、No.2と5の花粉親がBであったことが分かる。No.3の花粉親は、プライマー#1と#2のマーカースの情報ではAであると考えられたが、この個体にはAが保有していないプライマー#3のマーカースが出現している。したがって、この個体の花粉親は採種園構成クローンである3クローン以外の個体であることが判明し、花粉汚染が生じていたことが分かる。これら3個のマーカースによって得られた結果から、実生苗 No.1の花粉親がA、No.2と5がB、No.3が花粉汚染、No.4が自殖であると決定される。このようにして、28個のマーカースについて、各実生苗の表現型と採種園構成クローンの遺伝子型とを比較し、田辺ーク54号実生苗85本の花粉親を識別した。

採種園構成クローンが花粉親としてそれぞれ均等に寄与していれば、各クローンの寄与率はそれぞれ1/16 (6.25 %) となることが期待される。この採種園における各クローンの寄与率の実測値が任意交配の期待値と同程度といえるかどうかについて、自由度15の χ^2 検定を行った。

3. 4. 3 結果

28個のマーカースによる情報を用いて、各実生苗の花粉親を識別した結果(Appendix-1)、調査した85本のうち82個体(96.5 %)の花粉親を識別することができた。識別ができなかった3個体の花粉親は、それぞれ、大分ーク8号か波方ーク37号、津屋崎ーク50号か

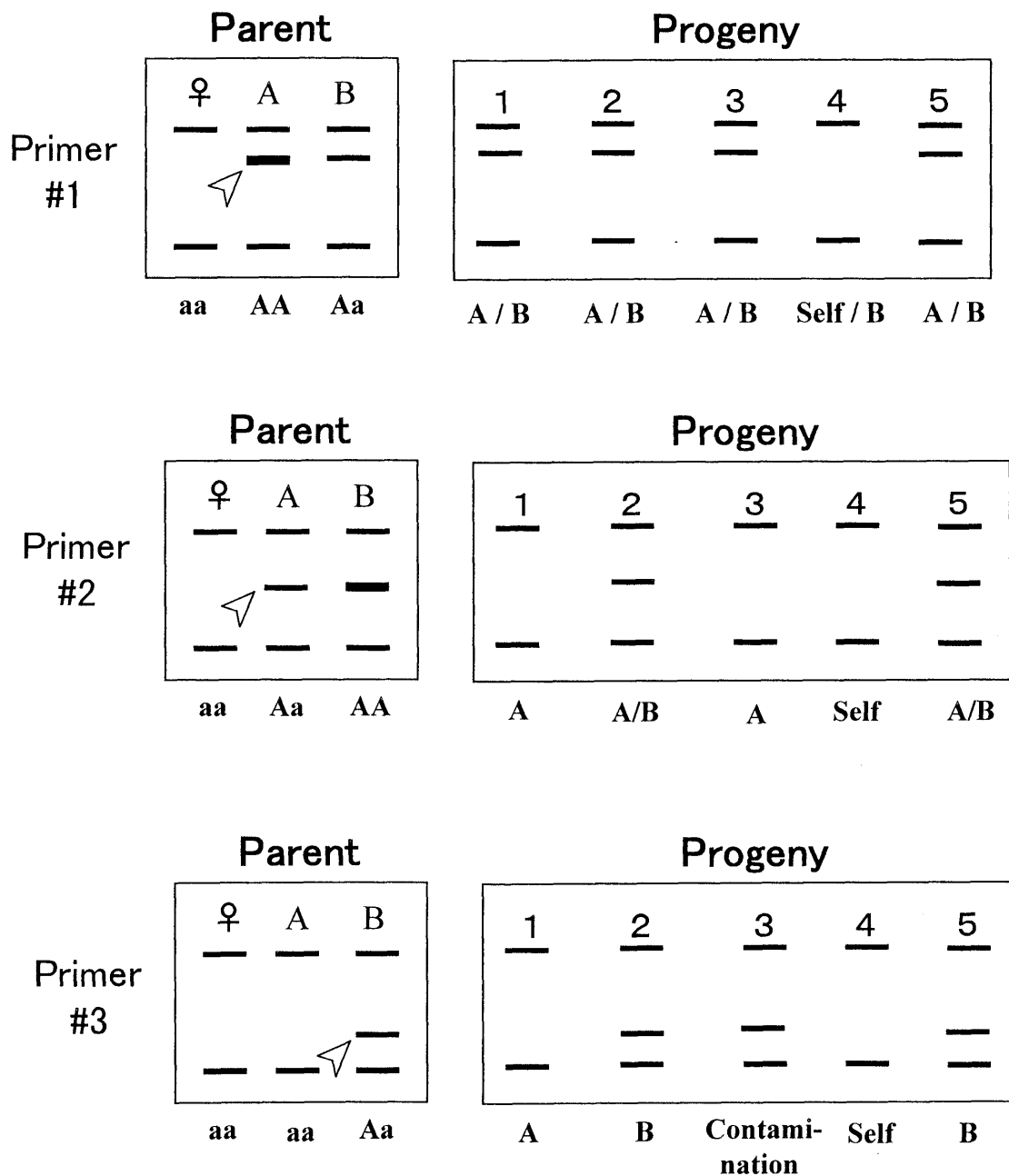


Fig 3.4-1 Procedure of determinating the male-parent of open-pollinated half-sib progeny.

Arrows show the polymorphic fragments used for the identification of the male parents.

大瀬戸ーク 12 号、三崎ーク 90 号か波方ーク 37 号のいずれかであった。特定できた 82 個体のうち、2 個体の花粉親は採種園構成クローンのいずれとも一致せず、花粉汚染によるものであることが判明した。また、田辺ーク 54 号の自殖による実生苗は 1 個体であった。本研究では、80 個体の花粉親が、採種園構成クローンであった。任意交配が行われているとすれば、各クローンが花粉親として寄与した実生苗の数は 5.00 (80/16) 本となる。しかし、 χ^2 検定を行った結果、任意交配からは有意に偏った交配実態であることが明らかとなった ($\chi^2 = 187.6$, $p < 0.001$, $df = 15$)。採種園構成クローンでは、特に波方ーク 37 号と津屋崎ーク 50 号の交配寄与率が高く、それぞれ 29.3 %、28.0 %であった。また、全く交配に寄与していなかったものは 7 クローンであった (Table 3.4-1)。

3. 4. 4 考察

第 2 章第 4 節では、採種園産種苗の花粉親を識別するために、RAPD マーカーを利用した新たな花粉親識別法を開発した。本節では、この方法を福岡県採種園に適用し、種子多産型クローンである田辺ーク 54 号の自然交配実生苗 85 個体のうち 96.5 %の花粉親を識別することができた。RAPD マーカーは操作が簡便で、用いる設備も比較的安価であるため (Waugh and Powell, 1992; 後藤ら, 2000)、多くの研究室で利用することができる。また、RAPD マーカーの開発には、塩基配列に関する事前の情報が必要ない。本研究では、針葉と雌性配偶体を用いて各クローンの遺伝子型を決定し、実生苗の表現型と採種園構成クローンの遺伝子型とを比較することによって実生苗の花粉親を識別する方法を開発した。この方法は、理論的には全ての針葉樹採種園においても応用可能である。ただし、本研究における花粉親の候補、すなわち採種園構成クローンの数は 16 と比較的少なかったにもかかわらず、ほぼ完全な花粉親の識別には 28 個のマーカーが必要であった。花粉親の候補が多くなる、つまり採種園構成クローンの数が多くなると、さらに多くのマーカーが必要となり、マーカーの探索と遺伝子型の決定にはかなりの労力が必要となると予想される。我が国の精英樹採種園の場合、25 あるいは 49 クローンが用いられることが多いが、RAPD マーカーを用いた花粉親識別法が適用できるのは 25 クローン程度までが現実的であろうと思われる。

針葉樹の花粉は風によって長距離散布されるため、採種園における外部の未選抜集団からの花粉汚染はしばしば重大な問題となっている (Di-Giovanni and Kevan, 1991)。アイソザイムマーカによる分析では、Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) の採種園で 49 % (Adams

Table 3.4-1 The male parents identified by RAPD markers of the half-sib progeny of Tanabe-(t)54.

The male parent	Contribution to the fertilization	
	Number of	
	Seedlings	(%)
Namikata-(t)37	24	29.3
Tsuyazaki-(t)50	23	28.0
Sendai-(t)290	10	12.2
Yasu-(t)37	9	11.0
Ooseto-(t)12	5	6.1
Misaki-(t)90	4	4.9
Obama-(t)30	3	3.7
Tanabe-(t)54 ^a	1	1.2
Ooita-(t)8	1	1.2
Yoshida-(t)2	0	0.0
Tosashimizu-(t)63	0	0.0
Shima-(t)64	0	0.0
Obama-(t)24	0	0.0
Namikata-(t)73	0	0.0
Mitoyo-(t)103	0	0.0
Ei-(t)425	0	0.0
Contamination ^b	2	2.4
Total	82	100.0

Tanabe-(t)54^a : The seedlings which were self-pollinated by Tanabe 54.

Contamination^b : The seedlings which were seemed to be pollinated by outside pollen sources.

(Adams *et al.*, 1997)、Scots pine (*Pinus sylvestris*)の採種園で 21 ~ 38 % (Nagasaka and Szmidt, 1985; El-Kassaby *et al.*, 1989; Harju and Muona, 1989; Wang *et al.*, 1991)、Loblolly pine (*Pinus taeda*)の採種園で 36 % (Friedman and Adams, 1985)、と深刻なレベルでの花粉汚染が認められている。しかし、今回の花粉汚染率 2.4 %は、これらの報告例と比較して非常に低い値であった。宮原ら (1998) は、本採種園の周囲 500 m以内にはマツが存在しないことを確認している。したがって、採種園の周囲 500m にマツが存在しなければ花粉汚染がほとんど発生しないという本研究の知見は、クロマツ採種園の花粉隔離帯を設定する上で重要な基準となりうると考えられる。ただし、西日本地域では、マツノザイセンチュウ病によりクロマツの自然林が激減したこと (岸, 1995)、また、この採種園の周囲がスギ林で囲まれていることなどを考慮に入れる必要がある。

クローン採種園では、同じクローンのラメートが一定の範囲内に複数存在するため、自殖が生じる危険性が高いとされている (Fast *et al.*, 1986; Barrett *et al.*, 1987)。実際に、Radiata pine (*Pinus radiata*)の採種園や Scots pine の採種園では、10 %を超える自殖率がアイソザイム分析によって報告されている (Moran *et al.*, 1980; Müller-Strack, 1982)。本研究で対象としたマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成するクローン数はわずかに 16 であり、同一クローンのラメート間距離が約 18m と小さい。したがって、他の採種園に比べて自殖の機会が多いと予想された。それにもかかわらず、本節で用いた実生苗 85 本の中では、自殖苗はわずかに 1 本 (1.2 %)しか認められなかった。針葉樹では、自殖が起こると自殖弱勢が生じ、種子充実率や発芽率の低下、あるいは実生における早期段階での消失が発生することがよく知られている (Hadders and Koski, 1975)。勝田 (1964) はクロマツ 17 母樹について自家受粉の試験を行い、自家受粉では他家受粉よりも受粉した雌花数当たりの球果数 (結果率) が約 12 %低くなり、球果当たりの充実種子数が 41 %と低くなったとした。本研究では、供試材料に床替え後の実生苗を用いているため、自殖種子が自然に除かれている可能性が高い。いずれにしても、福岡県採種園産の実生苗では、自殖による遺伝的品質の低下はそれほど心配する必要がないと考えられた。

田辺ーク 54 号の実生苗における構成クローンの花粉親としての寄与数は、任意交配を仮定した場合の期待値から有意に偏っていた。この原因の一つとしては、母親である田辺ーク 54 号と花粉樹となる各クローンとの個体間距離の違いが挙げられる。Shen ら (1981) は、アイソザイムマーカーを用いて、Scots pine (*Pinus sylvestris*)の採種園の隣接する個体間の交配寄与率が 31 %に達していることを明らかにした。本研究でも、最も高い寄与率

(29.3 %)を示した波方ーク 37 号と 4 番目に高い寄与率 (11.0 %)を示した夜須ーク 37 号は、田辺ーク 54 号のすぐ隣に位置していた。また、Schoen and Stewart(1986) は、アイソザイムマーカーを用いて、White spruce(*Picea glauca*)の採種園で各クローンの雄花数と花粉親としての交配寄与率を調査し、一定レベルまでは雄花数が増加するにつれて交配寄与率が高くなるとした。本節で、2 番目に高い寄与率 (28.0 %)を示した津屋崎ーク 50 号は、1996 年の交配時期における観察結果から非常に花粉飛散量が多いことが確認されており、この説を裏付ける結果が得られた。一方、小浜ーク 24 号はこのクローンのすぐ隣に位置し、雄花着生量の多いクローン (九州地区林業試験研究機関連絡協議会・育種部会, 1999) であるにもかかわらず、田辺ーク 54 号実生苗には花粉親として全く寄与していなかった。戸田ら (1994a)は、構成クローンの開花期を 2 年間調査した。その結果、小浜ーク 24 号の花粉飛散時期は、いずれの年も田辺ーク 54 号雌花の受粉期よりもかなり遅れていることが明らかにされた。このように雌花と雄花の開花期の一致性が交配に大きく影響することが、Douglas-fir の採種園で報告されている (El-Kassaby *et al.*, 1988; Erickson and Adams, 1989)。このように、さまざまな原因から実際の採種園では、理想とする任意交配にならないことがある (Schoen *et al.*, 1986)。しかし、本採種園では、構成するクローン数の約半分が交配に全く寄与しておらず、各クローンの花粉親としての寄与の均等化を図る必要があることが示された。

以上のように、第 2 章第 4 節で開発した RAPD マーカーは、採種園産の自然交配実生苗の花粉親を識別するのに有効であった。また、福岡県採種園においては、花粉汚染と自殖の影響は少ないが、交配様式は任意交配から著しく偏った状況であり、構成クローンの花粉親としての寄与を均等化する遺伝子管理が必要であると考えられた。

第5節 結論

本章では、第2章で開発した遺伝子管理技術を実際の採種園に適用し、それぞれの技術の有効性を検証するとともに、採種園におけるクローン管理と交配の実態を解明した。

第2節では、第2章第2節で開発した RAPD マーカーの表現型によるクローン識別法を鹿児島県採種園の南側区域に適用した。その結果、調査した 186 個体のうち、約 2 割に相当する 37 個体の実際の配置が植栽位置図とは異なっていることが判明した。37 個体のうち 21 個体は、植栽列の見誤りによる植栽ミスであると考えられた。このように植栽列の見誤りが多発した原因としては、南側区域の形が三角であるため、三角形の一辺と採種園の縦や横のラインとを混同しやすいためであると考えられた。また、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成するクローンの中には、波方ーク 73 号と波方ーク 37 号という紛らわしい名前をもつクローンが存在するが、これらを取り違えたと考えられる個体が 4 個体存在した。このような人為的ミスにより、12 箇所で同一クローンが隣り合って配置されており、早急に適切なクローンに改植する必要があることが明らかとなった。また、その表現型が採種園構成クローンのいずれとも一致せず、台木の立ち上がりと考えられた個体が 3 個体認められた。以上のように、本研究で開発したクローン識別法は、採種園構成個体の遺伝子管理に有効な手段として用いることができた。

第3節では、第2章第3節で開発したクローン識別の簡便化法（バルク法）を福岡県採種園に適用した。採種園を構成する 14 クローン合計 157 個体について、植栽位置図に従って同一クローンを最大 4 個体まで等量混合し、14 クローン×3 種類、合計 42 種類の混合サンプルを調製した。15 個のマーカーを用いて、これらの混合サンプルと基準個体の表現型を比較した結果、3 種類の混合サンプルの表現型が基準個体のそれとは異なっていた。そこで、これらの混合サンプルを構成する合計 12 個体から、個別に DNA を抽出し、第2章第2節の方法で各個体のクローン識別を行った。その結果、波方ーク 73 号の個体 No. 135 が土佐清水ーク 63 号であり、波方ーク 37 号の個体 No. 139 と志摩ーク 64 号の個体 No. 8 が採種園構成クローンではない不正規な個体であることが明らかとなった。この方法を用いることによって、157 個体のクローン識別を個体ごとに分析を行う場合の約 3 分の 1 の実験量で行うことができた。したがって、本研究で開発した簡便化法は、採種園個体の遺伝子管理を効率的に行う上で有効であることが明らかとなった。

第4節では、第2章第4節で開発した採種園種苗の花粉親識別法を、福岡県採種園に適

用した。福岡県採種園から産出された田辺ーク 54 号の自然交配実生苗 85 個体の花粉親を識別し、採種園における交配実態を解明した。28 個のマーカーを用いて分析した結果、96.5 %に相当する 82 個体の花粉親を識別することができた。したがって、本研究で開発した花粉親識別法は、実際の採種園においても有効な手段となりうることが明らかとなった。また、その結果から、本採種園では、花粉汚染率と自殖率は問題ないレベルであることが示された。一方、各クローンの花粉親としての寄与率は、均等な状態からは著しく偏っており、特定のクローンが優占している反面、半分近いクローンが全く寄与していなかった。したがって、本採種園では、花粉親としての寄与を均等化するための遺伝子管理を行う必要があることが示された。

第4章 採種園構成クローンの母親および花粉親としての遺伝的評価

第1節 序

本研究では、採種園における遺伝子管理に有効な RAPD マーカーを探索し、そのマーカーを用いたクローン識別法および採種園産種苗の花粉親識別法を開発した（第2章）。また、それらの識別技術を実際の採種園に適用し、クローン管理および交配の実態を明らかにした（第3章）。しかし、採種園における遺伝子管理を行うためには、これらのデータに加えて、採種園構成クローンの遺伝的評価が必要である。採種園を構成する個体は、母親としてだけでなく、花粉親としても採種園産種苗の遺伝的品質に影響を与える。したがって、採種園構成クローンは、母親と花粉親としての両面からの評価を行う必要がある。

第2節では、造成から12年が経過し、成熟期に入った福岡県採種園において、採種園構成クローンの採種園産種子に対する母親としての寄与の程度を評価した。

第3節では、第2章第4節で開発した田辺ーク54号実生苗の花粉親識別法を、他の家系にも応用した。そして、採種園構成クローンの採種園産実生苗に対する花粉親としての寄与の程度を評価した。

第4節では、第3節で花粉親を識別した家系別実生苗に、マツノザイセンチュウを接種し、各個体の生存状況を調査した。そして、接種試験から6ヶ月後に最終的な調査を行い、各クローンが母親となった場合と花粉親となった場合について、各クローンの次世代集団のマツノザイセンチュウ抵抗性への寄与を評価した。

第2節 採種園産種子に対する母親としての寄与

4. 2. 1 はじめに

採種園では、構成する全てのクローンが同程度の雌花を着生し、採種園産種子における各クローン種子の割合が均等となることが理想である (Eriksson *et al.*, 1973; El-Kassaby *et al.*, 1984; Wheeler and Jech, 1992)。しかし、採種園を構成するクローンは、着花性、種子生産性などがそれぞれ異なり、この条件が満たされていないことが、Norway spruce(*Picea abies*)、Black spruce(*Picea mariana*)、Radiata pine(*Pinus radiata*)、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)、White spruce(*Picea glauca*)の採種園などで報告されている (Eriksson *et al.*, 1973; Griffin, 1982; 勝田, 1982; O'reilly *et al.*, 1982; Schoen *et al.*, 1986)。採種園産種子における各クローン種子の構成割合の差が小さければ、採種園産種子の遺伝的品質に与える影響も小さいが、クローン間差が大きいとその影響も大きくなる。したがって、採種園構成クローンの母親としての採種園産種子に対する寄与の程度を評価することは重要である。

マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成する 16 クローンについては、戸田ら(1993)の報告や抵抗性マツ特性表 (九州地区林業試験研究協議会育種部会, 1999) の評価値から、各クローンの母親としての種子生産能力をある程度把握することができる。また、川内 (2000) は、鹿児島県の採種園産種子における各クローン種子の構成割合を種子重の比較によって求めた。しかし、川内 (2000) の報告例を除き、成熟期に入った採種園における各クローンの種子生産能力や、採種園産種子における各クローン種子の構成割合に関する具体的な数値はほとんど示されていない。そこで、本研究では、造成から 12 年が経過し、成熟期に入った福岡県小郡市のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園 (以下、福岡県採種園とする) において、採種園構成クローンの種子生産能力と採種園産種子における各クローン種子の構成割合を明らかにすることを目的とした。そこで、採種園構成クローンのそれぞれについて、1 ラメート当たりの球果数と 1 球果当たりの充実種子数を調査し、1 ラメート当たりの充実種子数を算定した。また、1 ラメート当たりの充実種子数にラメート数を掛け合わせて、採種園産種子における各クローン種子の構成割合を推定した。

4. 2. 2 材料と方法

1 ラメート当たりの球果数を推定するために供試した材料は、福岡県採種園に定植され

た 15 クローン、各 6 個体である。福岡県採種園では、毎年 10 月に脚立を用いて球果採取を行っており、主に利用できる球果は地上高 4 m 以内のものである。そこで、1999 年 12 月～2000 年 3 月に、調査個体の地上高 4 m 以内に認められた球果を全て数え、1 ラメート当たりの球果数を求めた。

1 球果数当たりの充実種子数については、1997 年に採取した各クロンの球果を 1 クローン当たり無作為に 10 球果選び、各球果から得られた充実種子を数えた。

1 ラメート当たりの充実種子数については、1 ラメート当たりの球果数の平均値に 1 球果当たりの充実種子数の平均値を掛け合わせて算定した。

クローン当たりの充実種子数は、算定した 1 ラメート当たりの充実種子数に 1999 年 3 月現在で造成当時から生存している各クロンのラメート数を掛け合わせるによって推定した。なお、枯損した箇所には補植苗が植栽されていたが、調査時点ではほとんど球果が付いていなかったため、クローン当たりの充実種子数の推定には算入しなかった。

採種園産種子における各クローン種子の構成割合は、クローン当たりの充実種子数の合計に対する各クロンの充実種子数の割合によって求めた。

4. 2. 3 結果

1 ラメート当たり球果数のクローンごとの平均は 7.2 ～ 480.8 の範囲で、15 クロンの平均は 110.5 であった。1 球果当たり充実種子数のクローンごとの平均は、11.4 ～ 50.2 の範囲で、15 クロンの平均は 36.2 であった (Table 4.2-1)。1 ラメート当たりの球果数と球果数当たりの充実種子数について、1 元配置の分散分析を行った結果、どちらも 0.1 % 水準でクローン間に有意な差が認められた (Table 4.2-2)。次に、1 ラメート当たりの球果数の平均値と 1 球果当たりの充実種子数の平均値を掛け合わせて、1 ラメート当たりの充実種子数をクローンごとに算定した。その結果、最小の土佐清水ーク 63 号は 237.2、最大の田辺ーク 54 号は 23,464.7 と、クローンによって大きな差が認められた。

調査を行った 1999 年 3 月の時点で、造成当時から生存している各クロンのラメート数は 7 ～ 13 個体で、15 クロンの平均は 10.9 個体であった。各クロンのラメートの枯死率 (Mortality) は 0.0 ～ 41.7 % の範囲で、採種園全体では 12.8 % であった。算定した 1 ラメート当たりの充実種子数に造成当時から生存しているラメート数を掛け合わせて、1 クローン当たりの充実種子数を推定した。その結果、1 クローン当たりの充実種子数は、2,846.6 ～ 281,576.0 粒の範囲であり、15 クロンの平均は 44,859.3 粒であった。クローン

Table 4.2-1 Estimation of number of cone per ramet, sound seed per cone, and sound seed per ramet

Clone	Cone per ramet			Sound seed per cone			Sound seed per ramet (axb)
	Avg. ^a	±	SE	Avg. ^b	±	SE	
Namikata—(t)73	44.8	±	14.5	29.3	±	1.5	1313.6
Obama—(t)30	44.7	±	11.2	40.8	±	3.0	1822.4
Tosashimizu—(t)63	7.2	±	1.4	33.1	±	1.6	237.2
Oita—(t)8	161.8	±	17.4	19.5	±	4.0	3155.8
Ei—(t)425	114.2	±	19.5	46.3	±	2.5	5285.9
Tsuyazaki—(t)50	21.2	±	4.4	40.0	±	3.8	846.7
Misaki—(t)90	212.8	±	34.5	11.4	±	2.6	2426.3
Oseto—(t)12	30.2	±	9.1	36.0	±	1.5	1086.0
Namikata—(t)37	158.2	±	28.1	32.1	±	2.5	5077.2
Tanabe—(t)54	480.8	±	71.9	48.8	±	2.6	23464.7
Yasu—(t)37	170.0	±	21.6	46.4	±	2.6	7888.0
Shima—(t)64	73.5	±	12.6	41.9	±	2.2	3079.7
Yoshida—(t)2	33.2	±	6.6	24.6	±	5.5	815.9
Sendai—(t)290	46.5	±	10.3	43.0	±	4.0	1999.5
Mitoyo—(t)103	57.8	±	7.6	50.2	±	2.9	2903.2
Average	110.5			36.2			4093.5

Avg.^a : Average cone per individual calculated by the 6 ramets of each clone.

Avg.^b : Average of sound seed per cone calculated by the 10 cones of each clone.

Table 4.2-2 Analysis of variance of the number of cones per individual and the number of sound seed per cone, produced from the seed orchard.

Source of variance	SS	df	MS	F	<i>p</i>
(a) Cone per individual					
Clones	1224340.82	14	87452.92	24.01	< 0.001
Error	273231.50	75	3643.09		
Total	1497572.32	89			
(b) Sound seed per cone					
Clones	17776.89	14	1269.78	13.63	< 0.001
Error	12575.40	135	93.15		
Total	30352.29333	149			

当たりの充実種子数の合計に対する各クローン種子の構成割合は 0.4 ～ 41.9 % の範囲であり、田辺ーク 54 号の優占度が 40 % を超えて特に高いことが明らかとなった (Table 4.2-3)。

4. 2. 4 考察

各クローンの 1 ラメート当たりの充実種子数はクローンによって著しい差が認められ、最大の田辺ーク 54 号は最小の土佐清水ーク 63 号の約 100 倍に達していた。このような差は、1 ラメート当たりの球果数に主に起因しており、最大の田辺ーク 54 号における 1 ラメート当たりの球果数は、最小であった土佐清水の 60 倍以上となっていた。採種園を構成する個体の着花数や種子生産数には、本研究と同様、クローン間で有意な差が、Radiata pine (Griffin, 1982)、Black spruce (O'reilly *et al.*, 1982)、White spruce (Schoen *et al.*, 1986) の採種園でも認められている。勝田 (1982) は、事業的生産を行っている長野営林局のヒノキ採種園において、22 クローンの雌花数を 3 年間にわたって調査し、着花性は順位変動の小さい安定した形質であると述べている。戸田ら (1993) は、林木育種センター九州育種場内に定植したマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成する 16 クローンの雌花着花性を 5 年間調査し、着花性は遺伝的特性と考えられるとしている。川内 (2000) は、鹿児島県のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園において、採種園産種子に対する各クローン種子の割合を 2 年間調査し、上位 5 クローンが同じクローンの組合せであったとしている。本研究の結果は、単年度の結果であり、継続した調査が必要であるが、これらの報告から考察すると、本研究で著しく低い種子生産性を示したクローンが異なる年に高い種子生産性を示す可能性は低いと考えられる。

クローン当たりの充実種子数がクローンによって異なっていたもう一つの要因は、1 球果当たりの充実種子数の違いである。この 1 球果当たりの充実種子数についても、0.1 % 水準でクローン間に有意な差があった。しかし、最大の三豊ーク 103 号は、最小の三崎ーク 90 号の約 4 倍であり、1 ラメート当たりの球果数に比べるとクローン間の差は小さかった。

戸田ら (1993) は、九州育種場内のクローン集植所にマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成する 16 クローンを定植し、種子生産性について調査を行っている。そして、調査した 10 クローンの平均で、定植 5 年目の 1 球果当たりの充実種子数が 5.8 であったとしている。一方、本研究では 15 クローンの平均で 35.1 であり、戸田ら (1993) が報告した値の 6 倍以上の値であった。自然交配したクロマツ (*Pinus thunbergii*) の 1 球果

Table 4.2-3 Clonal seed production level in the seed orchard of Fukuoka Prefecture.

Clone	No. ramets		Mortality (%)	Seed per ramet ^c	Clonal seed production (b*c)	Proportional contribution of clones
	1987 ^a	1999 ^b				
Namikata-(t)73	12	7	41.7	1313.6	9195.3	1.4
Obama-(t)30	13	13	0.0	1822.4	23691.2	3.5
Tosashimizu-(t)63	12	12	0.0	237.2	2846.6	0.4
Ooita-(t)8	13	12	7.7	3155.8	37869.0	5.6
Ei-(t)425	12	8	33.3	5285.9	42287.3	6.3
Tsuyazaki-(t)50	13	13	0.0	846.7	11006.7	1.6
Misaki-(t)90	12	11	8.3	2426.3	26689.3	4.0
Ooseto-(t)12	13	12	7.7	1086.0	13032.0	1.9
Namikata-(t)37	12	11	8.3	5077.2	55848.7	8.3
Tanabe-(t)54	13	12	7.7	23464.7	281576.0	41.8
Yasu-(t)37	12	10	16.7	7888.0	78880.0	11.7
Shima-(t)64	13	12	7.7	3079.7	36955.8	5.5
Yoshida-(t)2	12	12	0.0	815.9	9790.8	1.5
Sendai-(t)290	13	10	23.1	1999.5	19995.0	3.0
Mitoyo-(t)103	12	8	33.3	2903.2	23225.9	3.5
Total	187	163	12.8	61402.0	672889.5	100.0
Average	12.5	10.9		4093.5	44859.3	

1987^a: Number of ramets planted in 1987 that the seed orchard was established.

1987^b: Number of ramets survived in 1999 that we have investigated.

Seed per individual^c: The value was calculated in Table 4.2-1.

当たりの充実種子数について、渡辺・岩川（1969）は 33.1、中井ら（1967）は 35.7 としており、本研究の値と同程度であった。戸田ら（1993）が報告した値がこれらの値よりも著しく低かった原因としては、1）未成熟の若い個体を用いていること、2）種子生産のための管理が行われていないクローン集植所の個体を用いていること、の2つの理由が考えられる。したがって、各クローンの種子生産能力を評価するためには、成熟期の採種園における個体を用いた調査を行う必要があると考えられた。

ラメートの枯死率は 0.0 ～ 41.9 % と、クローンによって大きく異なっていた。その原因の一つは台木と接ぎ穂の接ぎ木不親和であり、特に、枯死率の高かった波方ーク 73 号と三豊ーク 103 号の2クローンでは、接ぎ木部位の付近が盛り上がり、着葉量が著しく低い個体が多数観察された。Slee and Spidy(1970)は、*Pinus caribaea* の接ぎ木において、接ぎ穂クローンの実生後代を台木に用いることにより、接ぎ木不親和の発現をある程度抑制できたとしている。したがって、これらのクローンでは、自らの実生後代を台木として選択するなどの措置を検討する必要がある。しかし、接ぎ木不親和性はクローンによる差が著しく（Hong, 1975）、接ぎ木そのものが困難なクローンも存在する。クロマツは一般に挿し木が困難な樹種（戸田, 1953; 小笠原, 1962; 大山・豊島, 1965）とされるが、条件によっては挿し木が可能であることも近年報告されている（石松, 1998; 後藤, 1999）。また、組織培養によるクローン増殖法も報告されており（石井, 1993; 後藤・宮原, 1997; 三樹, 1998; Goto and Sasaki, 1998; 後藤, 2000）、これらの技術の適用も考慮する必要がある。枯死原因のもう一つは、マツノザイセンチュウ病によるものであった。抵抗性クローンは一定レベル以上の抵抗性を有しているという条件で選抜されているが、限界量を超えたマツノザイセンチュウ(*Bursaphelenchus xylophilus*)による侵入を受けると枯損することもある（戸田ら, 1993; 戸田・寺田, 1997）。福岡県採種園でも、枯死したいくつかの個体からマツノザイセンチュウが分離されている（小河, 私信）。

採種園産種子における各クローン種子の構成割合については、いくつかの採種園で報告がある。Eriksson ら（1973）は、スウェーデンの Norway spruce のクローン試験林で 20 クローンの雌花数を調査し、20 %に相当する 4 クローンで雌花数全体の 50 %以上を占めていたとした。Griffin(1982)は、オーストラリアの Radiata pine の採種園を構成する 30 クローンについて、各クローンが生産する種子数を調査した。そして、30 %に相当する 10 クローンの種子数合計が採種園産種子の 50 %以上を占めていたとした。O'reilly ら（1982）は、カナダの Black spruce の採種園を構成する 61 クローンから 12 クローンを抽出して雌

花数を調査し、30 %に相当する4クローンの雌花数が12クローン合計の50 %以上を占めていたとした。Schoenら(1986)は、カナダのWhite spruceの採種園を構成する33クローンの雌花数を2年間調査し、1984年には15 %に相当する5クローン、1985年には9.1 %に相当する3クローンの雌花数の合計が採種園全体の50 %以上を占めていたとした。本採種園では、調査した15クローンの13.3 %に相当する2クローンの種子が採種園産種子の50 %以上を占めていた。マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園では、構成クローン数が16と非常に少ないため、より多くのクローンが採種園産種子に寄与していることが望まれる。しかし、報告されている他の採種園における場合と比較して、本採種園では特定クローンの種子の優占割合が高い方であることが明らかとなった。

以上のことから、本採種園では、採種園産種子における各クローン種子の構成割合を均等化するために、早急に対策を取る必要があることが示された。十分な量の種子生産が行われている採種園においてまず考えられることは、構成割合が均等な状態になるようにクローンごとの球果採取量を調整することである。しかし、この方法では根本的な解決にはならない上に、種子生産量が不足している採種園においては適用することができない。本採種園の場合、全体の40 %を特定のクローンが占めているため、このクローンのラメート数を減らし、逆に寄与率の著しく低いクローンのラメート数を増やすという措置も検討される。その場合、ラメートの配置が不規則になることが予想され、同一クローンが隣接しないように配慮しなければならない。スギやヒノキの採種園では、ジベレリン GA₃ を適切な時期に施用することにより、各クローンの雌花数をある程度平準化できることが知られている(金川・桑原, 1984; 金川・北川, 1987)。しかし、クロマツでは、極性の低いジベレリン GA₄₊₇ が雄花の着花促進に効果があったとする報告があるが(金川, 1979; Kanekawa and Katsuta, 1982; 戸田ら, 1993)、雌花に対しては顕著な効果が現れていない。近年、アカマツ(*Pinus densiflora*)では、BAP処理をすることにより、雌花を雄花に転化できるとの報告があり(Wakushima *et al.*, 1996; 1997)、この方法を応用することも含めてクロマツ雌花の着花促進法を早急に開発する必要がある。

第3節 採種園産実生苗に対する花粉親としての寄与

4. 3. 1 はじめに

採種園産種苗に対する採種園構成クローンの花粉親としての寄与は、これまで雄花数の調査結果から推定されてきた。このような推定が、Norway spruce(*Picea abies*)、Radiata pine(*Pinus radiata*)、ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)、White spruce(*Picea glauca*)、スギ(*Cryptomeria japonica*)の採種園において行われている(Eriksson *et al.*, 1973; 勝田, 1982; O'reilly *et al.*, 1982; Schoen *et al.*, 1986; 金川・北川, 1987)。しかし、実際の採種園における交配様式は、雄花数だけではなく、花粉樹と受粉樹の個体間距離(Erickson and Adams, 1989; Prat, 1995)や開花期の一致性(El-Kassaby *et al.*, 1988; Erickson and Adams, 1989)などの影響を受ける。したがって、採種園産種苗の花粉親を明らかにすることにより、採種園構成クローンの花粉親としての寄与の程度を評価する必要がある。第2章第4節では、田辺ーク54号の自然交配実生苗の花粉親識別法を開発し、第3章第4節では、その方法を福岡県採種園に実際に適用した。本節では、この花粉親識別法を他の家系の自然交配実生苗にも応用し、採種園構成クローンの花粉親としての寄与の程度を評価した。

4. 3. 2 材料と方法

供試材料

供試材料は、第3章第4節で分析した田辺ーク54号と充実種子が採取できなかった小浜ーク24号を除く、14家系の自然交配実生苗(以下、家系別実生苗とする)648個体である。これらの家系別実生苗は、1997年10月に福岡県採種園において各クローンそれぞれ1個体から球果を採取し、1998年4月に福岡県森林林業技術センター苗畑に播種したものである。そして、1999年3月に床替えをした後、1999年6月に各個体から針葉約150mgを採取した。なお、針葉からのDNA抽出およびRAPD分析の方法は、第2章第2節と同様である。

RAPD マーカーにおける採種園構成クローンの遺伝子型の決定

第2章第2節および第2章第4節でスクリーニングを行った326種類のプライマーの中で、16クローン間で多型的で田辺ーク54号が保有していたフラグメントについて、16クローンを用いた3回のPCR反応による再現性テストを実施した。再現性テストの条件は、第2章第2節と同様である。そして、再現性テストに合格したフラグメントを花粉親識別

のマーカ―として取得した。取得したマーカ―について、第2章第4節と同様の方法で、採種園を構成する16クロンの遺伝子型を決定した。

家系別実生苗の花粉親識別

取得したマーカ―を用いて家系別実生苗の花粉親を識別した。各家系について、取得したマーカ―のうち、母親クロンの遺伝子型が劣性ホモ型であるマーカ―になるべく多くなるように16種類のプライマーを選抜し、これらを用いて各実生苗のRAPD分析を行い、実生苗の表現型と採種園構成クロンの遺伝子型とを比較した。母親クロンの遺伝子型が劣性ホモ型である場合、花粉親の識別方法は第3章第4節と同様である。母親クロンの遺伝子型がヘテロ型である場合の花粉親の識別方法は以下の通りである。1) 実生苗にマーカ―が出現した場合、花粉親の遺伝子型は全てがあり得るため花粉親を絞り込むことはできない、2) 実生苗にマーカ―が出現しなかった場合、花粉親の遺伝子型は優性ホモ型ではあり得ないため、優性ホモ型である採種園構成クロンを花粉親候補から除外することができる。以上の方法で、各家系の実生苗の花粉親を識別した。供試した16種類のプライマーを用いた場合、花粉親が1クロンに特定できなかった実生苗については、各家系について数種類のRAPDプライマーをそれぞれ追加し、さらにRAPD分析を行った。

花粉親としての小浜ーク24号の識別

採種園構成クロンの一つである小浜ーク24号は、育種事業の中で抵抗性クロマツとして選抜されたが、その後の研究で、母樹であるクロマツ(*Pinus thunbergii*)にアカマツ(*Pinus densiflora*)の花粉が受精した雑種であることが判明した(渡辺ら, 1996)。クロマツとアカマツの葉緑体DNAの*rbcL*遺伝子上にはいくつかの変異があることが報告されており(白石・渡辺, 1995)、変異を含んだ領域をPCR増幅した後、RFLP(Restriction Length Polymorphism)分析(白石・渡辺, 1995)やSSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)分析(渡辺ら, 1997)を行うことにより、葉緑体DNAのアカマツ型とクロマツ型の識別を行うことができる。葉緑体DNAの父性遺伝は、*Pinus*, *Picea*, *Larix*などの針葉樹類で報告されており(Neale and Sederoff, 1989; Wagner, 1992)、アカマツとクロマツ間の人工交配家系においても父性遺伝することが確かめられている(渡辺ら, 1996)。したがって、両種間の雑種クロンである小浜ーク24号はアカマツ型の葉緑体DNAを有し、残る抵抗性クロンである15クロンはクロマツ型の葉緑体DNAを保有している。このことを利用して、宮原ら(1998)は、福岡県採種園における小浜ーク24号の花粉親としての採種園産種子に対する寄与率を調査し、その寄与率が任意交配を期待した場合の半分以下であ

ったとした。本研究では、1) RAPD 分析によって花粉親として識別された小浜ーク 24 号の葉緑体 DNA がアカマツ型となっているかどうか確認するため、2) 花粉親の候補に小浜ーク 24 号が含まれていた場合にはさらに花粉親を絞り込むため、白石・渡辺(1995)によって報告されている *rbcL* 遺伝子の一部を PCR 増幅して制限酵素 (*Hae* III) で切断し、アカマツ型とクロマツ型の葉緑体 DNA の判別を行う PCR-RFLP 分析を行った。

採種園構成クローンの花粉親としての寄与率

RAPD 分析および PCR-RFLP 分析の結果から、家系別実生苗における採種園構成クローンの花粉親としての寄与率を求めた。ここで、寄与率の算定方法を述べる。例えば、家系 A の自然交配実生苗 50 本を調査した結果、花粉親がクローン B に特定できた実生苗が 5 本あったと仮定する。また、50 本の中で花粉親が 1 クローンに絞り込めなかった実生苗が 4 本あり、そのうち 2 本の花粉親候補の中に B があったと仮定する。この場合、家系 A の実生苗における B の花粉親としての寄与数は、最小で 5、最大で 7 となる。したがって、家系 A の実生苗における B の寄与数は、(最大値と最小値の平均) \pm (変異幅)、すなわち 6 ± 1 となり、寄与率はこの値を調査本数で割った百分率、すなわち $(6 \pm 1) / 50 \times 100 = 12 \pm 2$ (%)と表現できる。つまり、各クローンの寄与数の最大値を C_{Max} 、最小値を C_{Min} とすると、寄与数の平均 C_M は、 $C_M = (C_{\text{Max}} + C_{\text{Min}}) / 2$ となる。また、各家系の自然交配実生苗の本数を N とすると、寄与率 P は、 $P = C_M / N \times 100 \pm (C_{\text{Max}} - C_M) / N \times 100$ である。以上の計算方法によって、各家系の実生苗における採種園構成クローンの寄与率を算定した。

花粉親としての寄与率と母樹とのクローン間距離

花粉親としての寄与率が 15 クローン全体で 5 % 以上であったクローンを花粉樹として、そのクローンと各家系の母親クローンとの個体間距離と寄与率との関係を調査した。福岡県採種園では、各個体は 5×5 m に配置されているため、クローン間の距離は、その配置に従って 5, 7.1, 10, 12.1 m の 4 種類である。そこで、各距離ごとの寄与率の平均と標準誤差を求めた。さらに、寄与率を逆正弦変換した値を用いて一元配置の分散分析を行い、寄与の程度に距離間で有意な差があるかどうか調べた。

4. 3. 3 結果

各家系における花粉親の識別率

本節では、第 2 章第 4 節で取得した 28 個のマーカーに加えて、17 個のマーカーを取得

Table 4.3-1 The Genotype of orchard clones at the newly selected markers decided by the analysis of the haploid megagametophytes.

Clone	A-16		A-17		D-03		F-03		F-05		G17		I10		P-14		S18		U3		U13		V1		V4		V17	
	560	860	950		700	800	720		570		590		530		900		700		700		580		340	370	850		780	
Tanabe-(t)54	Aa	aa	AA		AA	AA	Aa		AA		Aa		Aa		Aa		Aa		Aa		Aa		aa		Aa		Aa	
Namikata-(t)73	aa	aa	aa		Aa	aa	Aa		AA		Aa		Aa		aa		AA		Aa		Aa		aa		Aa		Aa	
Obama-(t)30	Aa	aa	aa		aa	Aa	aa		AA		aa		aa		aa		AA		aa		aa		AA		aa		AA	
Tosashimizu-(t)63	aa	aa	aa		Aa	Aa	AA		AA		aa		Aa		aa		aa		AA		Aa		aa		aa		AA	
Ooita-(t)8	aa	aa	Aa		Aa	Aa	aa		AA		Aa		aa		aa		AA		aa		aa		Aa		Aa		Aa	
Ei-(t)425	aa	aa	aa		aa	AA	aa		AA		Aa		aa		aa		Aa		Aa		Aa		aa		aa		Aa	
Tsuyazaki-(t)50	aa	aa	aa		AA	Aa	Aa		Aa		aa		aa		aa		AA		Aa		aa		Aa		aa		Aa	
Misaki-(t)90	aa	aa	aa		Aa	aa	aa		AA		aa		aa		aa		AA		Aa		Aa		aa		aa		Aa	
Ooseto-(t)12	aa	aa	aa		Aa	Aa	aa		Aa		aa		AA		Aa		AA		Aa		aa		Aa		aa		Aa	
Namikata-(t)37	Aa	aa	aa		Aa	aa	Aa		AA		Aa		Aa		aa		aa		aa		aa		AA		aa		Aa	
Yasu-(t)37	Aa	aa	aa		AA	AA	aa		AA		Aa		aa		aa		Aa		Aa		aa		AA		Aa		AA	
Shima-(t)64	aa	aa	aa		aa	AA	aa		AA		aa		aa		Aa		Aa		aa		Aa		aa		aa		AA	
Yoshida-(t)2	aa	aa	aa		Aa	aa	aa		AA		Aa		aa		aa		AA		aa		Aa		aa		Aa		Aa	
Sendai-(t)290	aa	aa	aa		aa	AA	aa		Aa		Aa		aa		Aa		Aa		Aa		aa		Aa		aa		Aa	
Mitoyo-(t)103	aa	aa	aa		aa	Aa	Aa		Aa		aa		Aa		aa		AA		AA		aa		Aa		aa		Aa	
Obama-(t)24	Aa	Aa	aa		aa	aa	Aa		Aa		Aa		aa		Aa		aa		Aa		Aa		Aa		aa		Aa	

AA : a dominant homozygosity, Aa : a dominant heterozygosity, aa : a recessive homozygosity

Table 4.3-2 RAPD primers used for the identification of the male parent in the progenies.

Progeny	Primers used for the identification of the male parent							
Namikata-(t)73	A-09 F-16	A-12 I-10	A-16 M-17	A-17 U-09	D-01 V-01	D-03 V-04	F-01 V-17	F-05 W-14
Obama-(t)30	A-11 G-17	A-12 I-10	A-16 U-03	A-17 U-09	C-09 U-13	D-03 V-04	F-03 V-17	F-05 W-14
Tosashimizu-(t)63	A-09 F-16	A-11 G-17	A-12 I-10	A-16 S-10	A-17 S-18	D-01 V-01	D-03 V-04	F-05 W-14
Ooita-(t)8	A-11 I-10	A-12 M-17	A-16 S-10	A-17 U-03	C-09 U-13	D-01 V-01	D-03 V-04	F-03 W-14
Ei-(t)425	A-09 F-05	A-11 F-16	A-12 I-10	A-16 S-18	A-17 U-09	C-09 V-01	D-03 V-04	F-03 V-17
Tsuyazaki-(t)50	A-09 G-17	A-11 I-10	A-16 M-17	A-17 S-10	C-09 U-09	D-03 U-13	F-05 V-01	F-16 V-04
Misaki-(t)90	A-09 F-16	A-11 G-17	A-12 I-10	A-16 M-17	A-17 U-09	C-06 V-01	D-03 V-04	F-03 V-17
Ooseto-(t)12	A-09 F-03	A-11 F-05	A-12 G-17	A-16 I-10	A-17 U-09	C-09 U-13	D-01 V-01	D-03 V-04
Namikata-(t)37	A-09 I-10	A-11 S-18	A-12 U-03	A-17 U-09	C-09 U-13	D-01 V-04	D-03 V-17	F-01 W-14
Yasu-(t)37	A-09 I-10	A-11 M-17	A-12 S-18	A-16 U-13	A-17 U-13	F-03 V-04	F-05 V-17	F-16 W-14
Shima-(t)64	A-09 G-17	A-11 I-10	A-12 S-18	A-16 U-03	A-17 U-09	D-03 V-01	F-03 V-04	F-05 W-14
Yoshida-(t)2	A-09 F-05	A-11 I-10	A-16 U-09	A-17 U-13	C-09 V-01	D-01 V-17	D-03 V-04	F-03 W-14
Sendai-(t)290	A-09 F-16	A-11 I-10	A-16 S-18	A-17 U-13	C-09 V-01	D-03 V-04	F-03 V-17	F-05 W-14
Mitoyo-(t)103	A-11 G-17	A-12 I-10	A-16 U-09	A-17 U-13	C-09 V-01	D-01 V-04	D-03 V-17	F-05 W-14

できた (Table 4.3-1)。各家系の花粉親識別において、最初に用いた 16 種類のプライマーは Table 4.3-2 の通りである。これら 16 種類のプライマーを用いて、各家系の実生苗を RAPD 分析した結果を Appendix-2 に示す。花粉親の識別率は家系によって異なり、波方ーク 73 号の 61.7 %～波方ーク 37 号の 87.8 %の範囲で、全 14 家系では 76.1 %であった (Table 4.3-3)。そこで、花粉親が 1 クローン識別できなかった実生苗に対して、家系ごとに数種類のプライマーをそれぞれ追加して (Table 4.3-4)、花粉親をさらに識別した。また、PCR-RFLP 分析により、花粉親としての小浜ーク 24 号を識別した。その結果、各家系における花粉親の識別率は、波方ーク 73 号の 72.3 %～三豊ーク 103 号の 95.2 %の範囲で、全 14 家系では 86.3 %に向上した (Table 4.3-3)。

採種園構成クロンの交配寄与

第 3 章第 4 節で分析した田辺ーク 54 号の結果を加えた 15 家系の自然交配実生苗 733 個体における採種園構成クロンの寄与率を Table 4.3-5 に示す。各家系の自殖率は、 $0.0 \pm 0.0 \sim 5.2 \pm 5.2$ %の範囲であり、全体では 1.5 ± 1.1 %であった (Table 4.3-6)。各家系の花粉汚染率は、 $0.0 \sim 4.1$ %の範囲であり、全体では 2.2 %であった。家系別に花粉親の構成割合を比較すると、上位 4 クローンの花粉親としての寄与率は、調査した全ての家系で 50%以上となっていた。特に、大分ーク 8 号、夜須ーク 37 号、志摩ーク 64 号の 3 家系では、特定の 1 クローンが花粉親として 50 %以上も寄与していた。各家系の実生苗における花粉親としての寄与率について、上位 4 クローンと下位 4 クローンをそれぞれ調べ、各クロンが上位あるいは下位 4 クローンに含まれていた家系数の合計を Fig 4.3-1 に示した。上位 4 クローンとなっていた家系数が最も多かったのは、津屋崎ーク 50 号の 12 家系であった。次いで、波方ーク 37 号、川内ーク 290 号、大瀬戸ーク 12 号、三崎ーク 90 号は 9 家系以上で上位 4 クローンとなっていた。逆に、下位 4 クローンとなっていた家系数が最も多かったのは、土佐清水ーク 63 号の 12 家系であった。次いで、志摩ーク 64 号、吉田ーク 2 号、田辺ーク 54 号などが 8 家系以上で下位 4 クローンとなっていた。したがって、家系別実生苗の花粉親には、常に少数の限定されたクロンの組合せが優占していること、逆に、いくつかのクロンの組合せは常に寄与していないこと、が示された。

家系別実生苗全体に対する各クロンの花粉親としての寄与率を調べた結果、津屋崎ーク 50 号が最も高く、全体の 24.8 %を占めていた。次いで、15.2 %の大瀬戸ーク 12 号、14.0 %の波方ーク 37 号、12.2 %の川内ーク 290 号、9.5 %の三崎ーク 90 号の順であった。逆に、寄与率が低いクロンは、0.8 %の志摩ーク 64 号、0.9 %の土佐清水ーク 63 号、1.4

**Table 4.3-3 Discrimination rate of the male parents
in the progenies.**

Progeny	Number of individuals	Identification of the male parent			
		16 primers		Further analyses ^b	
		No. ^a	(%)	No. ^a	(%)
Namikata-(t)73	47	29	61.7	34	72.3
Obama-(t)30	48	35	72.9	43	89.6
Tosashimizu-(t)63	45	28	62.2	42	93.3
Ooita-(t)8	45	29	64.4	37	82.2
Ei-(t)425	46	37	80.4	40	87.0
Tsuyazaki-(t)50	46	37	80.4	39	84.8
Misaki-(t)90	49	35	71.4	41	83.7
Ooseto-(t)12	48	32	66.7	37	77.1
Namikata-(t)37	49	43	87.8	44	89.8
Yasu-(t)37	49	38	77.6	42	85.7
Shima-(t)64	47	41	87.2	43	91.5
Yoshida-(t)2	49	40	81.6	43	87.8
Sendai-(t)290	38	33	86.8	34	89.5
Mitoyo-(t)103	42	36	85.7	40	95.2
Total	648	493	76.1	559	86.3

No.^a: Number of individuals identified the male parent in the progeny.

Further analyses^b: RAPD analysis with several primers and PCR-RFLP analysis.

Table 4.3-4 RAPD markers and primers used for the further analysis.

Progeny	RAPD markers used for the further analysis
Namikata-(t)73	A-11(490bp), F-19(490bp), P-14(900bp), U-03(700bp)
Obama-(t)30	F-16(610bp), S-10(390bp)
Tosashimizu-(t)63	P-14(900bp), M-17(490, 610bp)
Ooita-(t)8	C-06(820bp), S-10(390bp), U-03(700bp)
Ei-(t)425	F-19(490bp), P-14(900bp)
Tsuyazaki-(t)50	M-17(490, 610bp), P-14(900bp)
Misaki-(t)90	F-16(610), U-03(700bp)
Ooseto-(t)12	F-01(310bp), M-17(490, 610bp), U-03(700bp)
Namikata-(t)37	M-17(490, 610bp), S-10(390bp)
Yasu-(t)37	F-16(610bp), S-10(390bp)
Shima-(t)64	M-17(490, 610bp), S-10(390bp)
Yoshida-(t)2	S-10(390bp), U-03(700bp)
Sendai-(t)290	S-10(390bp), U-03(700bp)
Mitoyo-(t)103	C-06(820bp), F-19(490bp), P-14(900bp), S-10(390bp)

Table 4.3-5 Contribution of orchard clones as the male parent to the fertilization.

♀ \ ♂	Number of individuals	Namikata -(t)73	Obama- (t)30	Tosashimizu -(t)63	Ooita -(t)8	Ei- (t)425	Tsuyazaki -(t)50	Misaki -(t)90	Ooseto -(t)12
Namikata-(t)73	47	<u>1.1 ± 1.1</u>	5.3 ± 5.3	1.1 ± 1.1	8.5 ± 4.3	4.3 ± 4.3	11.7 ± 7.4	14.9 ± 2.1	16.0 ± 3.2
Obama-(t)30	48	9.4 ± 5.2	<u>1.0 ± 1.0</u>	0.0 ± 0.0	3.1 ± 1.0	0.0 ± 0.0	12.5 ± 0.0	10.4 ± 0.0	19.8 ± 1.0
Tosashimizu-(t)63	45	10.0 ± 3.3	2.2 ± 0.0	<u>0.0 ± 0.0</u>	2.2 ± 0.0	4.4 ± 0.0	4.4 ± 0.0	2.2 ± 0.0	30.0 ± 3.3
Ooita-(t)8	45	6.7 ± 4.4	0.0 ± 0.0	2.2 ± 2.2	<u>0.0 ± 0.0</u>	1.1 ± 1.1	3.3 ± 1.1	4.4 ± 2.2	63.3 ± 7.8
Ei-(t)425	46	8.7 ± 2.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.3 ± 4.3	<u>0.0 ± 0.0</u>	38.0 ± 3.3	10.9 ± 0.0	8.7 ± 0.0
Tsuyazaki-(t)50	46	17.4 ± 0.0	3.3 ± 3.3	6.5 ± 0.0	5.4 ± 5.4	5.4 ± 3.3	<u>4.3 ± 4.3</u>	20.7 ± 1.1	6.5 ± 0.0
Misaki-(t)90	49	4.1 ± 2.0	4.1 ± 2.0	0.0 ± 0.0	3.1 ± 1.0	1.0 ± 1.0	43.9 ± 3.1	<u>0.0 ± 0.0</u>	9.2 ± 3.1
Ooseto-(t)12	48	11.5 ± 5.2	4.2 ± 0.0	4.2 ± 0.0	8.3 ± 4.2	2.1 ± 2.1	15.6 ± 5.2	6.3 ± 0.0	<u>5.2 ± 5.2</u>
Namikata-(t)37	49	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	7.1 ± 1.0	24.5 ± 4.1	3.1 ± 1.0	17.3 ± 3.1
Tanabe-(t)54	85	0.0 ± 0.0	3.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.6	0.0 ± 0.0	27.6 ± 0.6	5.3 ± 0.6	6.5 ± 0.6
Yasu-(t)37	49	2.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.1 ± 1.0	1.0 ± 1.0	55.1 ± 2.0	14.3 ± 0.0	2.0 ± 0.0
Shima-(t)64	47	8.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.2 ± 1.1	2.1 ± 0.0	54.3 ± 1.1	6.4 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Yoshida-(t)2	49	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.1 ± 1.0	2.0 ± 0.0	17.3 ± 1.0	16.3 ± 0.0	18.4 ± 0.0
Sendai-(t)290	38	0.0 ± 0.0	2.6 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.6 ± 0.0	5.3 ± 2.6	13.2 ± 2.6	26.3 ± 0.0	21.1 ± 0.0
Mitoyo-(t)103	42	2.4 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.2 ± 1.2	0.0 ± 0.0	39.3 ± 1.2	8.3 ± 1.2	15.5 ± 1.2
Average	48.9	5.3 ± 1.5	2.0 ± 0.8	0.9 ± 0.2	3.4 ± 1.6	2.3 ± 1.0	24.8 ± 2.4	9.5 ± 0.5	15.2 ± 1.8

* Underlines showed the number of the selfed seedlings.

Table 4.3-5 (Continued)

♀ \ ♂	Number of individuals	Namikata -(t)37	Tanabe -(t)54	Yasu -(t)37	Shima -(t)64	Yoshida -(t)2	Sendai -(t)290	Mitoyo -(t)103	Obama -(t)24	Contami- nation
Namikata-(t)73	47	7.4 ± 7.4	8.5 ± 0.0	9.6 ± 1.1	3.2 ± 3.2	1.1 ± 1.1	21.3 ± 2.1	4.3 ± 4.3	0.0	2.1
Obama-(t)30	48	12.5 ± 4.2	2.2 ± 2.2	10.4 ± 0.0	3.1 ± 1.0	3.1 ± 1.0	16.7 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0	2.1
Tosashimizu-(t)63	45	8.9 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.0	24.4 ± 2.2	0.0 ± 0.0	6.7	0.0
Ooita-(t)8	45	17.8 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2 ± 2.2	0.0	2.2
Ei-(t)425	46	14.1 ± 1.1	0.0 ± 0.0	1.1 ± 1.1	0.0 ± 0.0	3.3 ± 1.1	8.7 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2	2.2
Tsuyazaki-(t)50	46	9.8 ± 5.4	4.3 ± 0.0	4.3 ± 4.3	1.1 ± 1.1	4.3 ± 4.3	19.6 ± 4.3	4.3 ± 4.3	6.5	2.2
Misaki-(t)90	49	12.2 ± 2.0	2.0 ± 0.0	3.1 ± 1.0	2.0 ± 2.0	0.0 ± 0.0	6.1 ± 2.0	5.1 ± 5.1	6.1	4.1
Ooseto-(t)12	48	15.6 ± 3.1	0.0 ± 0.0	19.8 ± 5.2	0.0 ± 0.0	1.0 ± 1.0	16.7 ± 6.3	4.2 ± 4.2	2.1	2.1
Namikata-(t)37	49	<u>4.1 ± 0.0</u>	2.0 ± 0.0	9.2 ± 1.0	1.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0	21.4 ± 1.0	0.0 ± 0.0	4.1	4.1
Tanabe-(t)54	85	29.4 ± 1.2	<u>1.2 ± 0.0</u>	10.6 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	11.8 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0	2.4
Yasu-(t)37	49	10.2 ± 4.1	0.0 ± 0.0	<u>2.0 ± 2.0</u>	1.0 ± 1.0	1.0 ± 1.0	2.0 ± 2.0	2.0 ± 2.0	2.0	4.1
Shima-(t)64	47	3.2 ± 1.1	2.1 ± 0.0	4.3 ± 2.1	<u>0.0 ± 0.0</u>	1.1 ± 1.1	12.8 ± 2.1	1.1 ± 1.1	2.1	0.0
Yoshida-(t)2	49	13.3 ± 1.0	0.0 ± 0.0	2.0 ± 2.0	0.0 ± 0.0	<u>1.0 ± 1.0</u>	14.3 ± 2.0	1.0 ± 1.0	4.1	2.0
Sendai-(t)290	38	21.1 ± 2.6	0.0 ± 0.0	5.3 ± 2.6	0.0 ± 0.0	3.9 ± 3.9	<u>2.6 ± 2.6</u>	2.6 ± 2.6	2.6	0.0
Mitoyo-(t)103	42	20.2 ± 1.2	2.4 ± 0.0	2.4 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.4 ± 0.0	<u>0.0 ± 0.0</u>	4.8	2.4
Average	48.9	14.0 ± 2.3	1.6 ± 0.1	5.9 ± 1.4	0.8 ± 0.6	1.4 ± 1.0	12.2 ± 1.7	1.7 ± 1.7	2.7	2.2

* Underlines showed the number of the selfed seedlings.

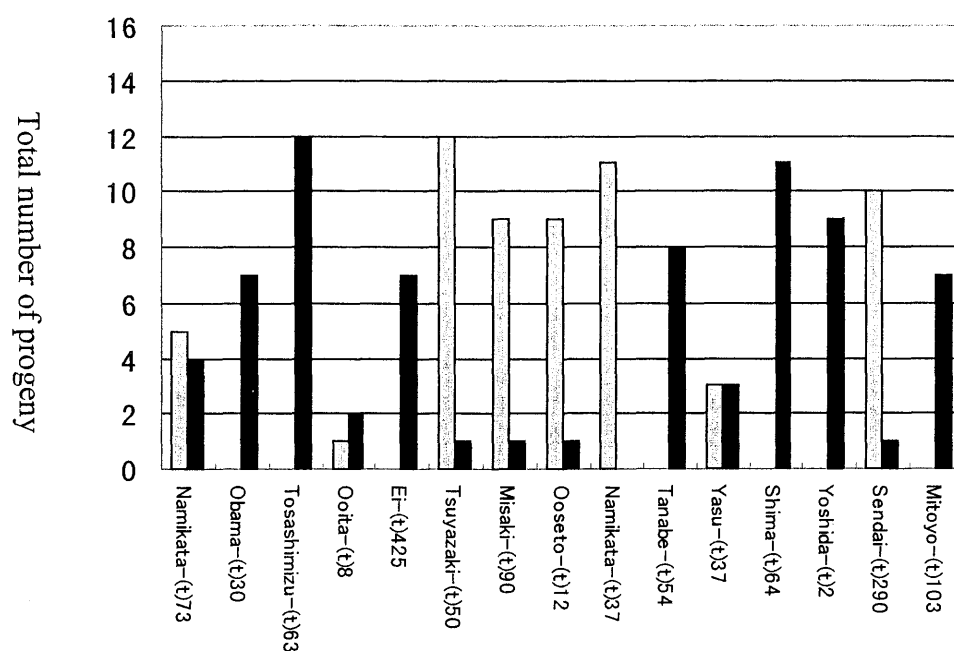


Fig 4.3-1 Total number of progeny for high and low contribution clones.

High contribution clones
 Low contribution clones

Table 4.3-6 Selfing in the progenies revealed by RAPD analysis.

Progeny	Number of individuals	Seedlings by selfing (%)	
Namikata-(t)73	47	0.5 ± 0.5	(1.1 ± 1.1)
Obama-(t)30	48	0.5 ± 0.5	(1.0 ± 1.0)
Tosashimizu-(t)63	45	0 ± 0	(0.0 ± 0.0)
Ooita-(t)8	45	0 ± 0	(0.0 ± 0.0)
Ei-(t)425	46	0 ± 0	(0.0 ± 0.0)
Tsuyazaki-(t)50	46	2 ± 2	(4.3 ± 4.3)
Misaki-(t)90	49	0 ± 0	(0.0 ± 0.0)
Ooseto-(t)12	48	2.5 ± 2.5	(5.2 ± 5.2)
Namikata-(t)37	49	2 ± 0	(4.1 ± 0.0)
Tanabe-(t)54	85	1 ± 0	(1.2 ± 0.0)
Yasu-(t)37	49	1 ± 1	(2.0 ± 2.0)
Shima-(t)64	47	0 ± 0	(0.0 ± 0.0)
Yoshida-(t)2	49	0.5 ± 0.5	(1.0 ± 1.0)
Sendai-(t)290	38	1 ± 1	(2.6 ± 2.6)
Mitoyo-(t)103	42	0 ± 0	(0.0 ± 0.0)
Total	733	11 ± 8	(1.5 ± 1.1)

* Seedlings by selfing is showed by mean±range.

%の吉田ーク 2 号、1.6 %の田辺ーク 54 号などであった。

花粉親としての寄与率とクローン間距離

家系別実生苗全体に対する寄与率が 5 %以上であった波方ーク 73 号、津屋崎ーク 50 号、三崎ーク 90 号、大瀬戸ーク 12 号、波方ーク 37 号、夜須ーク 37 号、川内ーク 290 号の 7 クローンを花粉樹クローンとして、母樹クローンとの個体間距離と花粉親としての寄与率を調べた (Fig 4.3-2)。平均寄与率では、縦および横に隣接した 5 m で 15.9 %、斜めに隣接した 7.1m で 16.4 %とほとんど差がなかったが、10m で 10.9 %、12.1m で 8.4 %と離れると低くなる傾向が見られた。寄与率を逆正弦変換して一元配置の分散分析を行った結果、5 %水準で距離間に有意な差が認められた (Table 4.3-7)。

4. 3. 4 考察

本研究では、DNA 分子マーカーを用いた新たな花粉親識別法を確立することが大きな課題であった。第 2 章第 4 節で開発した RAPD マーカーを用いた花粉親識別法を他の家系別実生苗に応用した結果、全体で 85 %以上の実生苗の花粉親を識別することができた。Schoen and Stewart(1986)は、アイソザイムマーカーを用いて、White spruce の採種園を構成する 33 クローンの中で、7 クローンの採種園産種子における各クローンの花粉親としての寄与率を明らかにした。また、Stoeckh ら (1998) は、cp-SSR(chloroplast-Simple Sequence Repeat)マーカーを用いて、Douglas-fir の採種園を構成する 20 クローンの中で 6 クローンの採種園産種子における各クローンの花粉親としての寄与率を明らかにした。本研究では、充実種子が得られた全ての家系の実生苗を対象とした。このように、採種園の全家系を対象に花粉親の識別を試みた例はなく、採種園における交配実態の全貌を初めて明らかにしたという点で、本研究の結果は新規性が高い。

各家系別の自殖率と花粉汚染率は、15 家系全体でそれぞれ 1.5 %と 2.2 %であった。これらの値は、田辺ーク 54 号実生苗における値とほぼ同様であった。したがって、本採種園では、自殖と花粉汚染による採種園産種子の遺伝品質の低下については、あまり考慮する必要がないことが改めて確認された。本採種園において、むしろ問題であると考えられたのは、採種園産種子に対する採種園構成クローンの花粉親としての寄与度の偏りであった。採種園産種苗には、各クローンが花粉親として均等に寄与することが望ましいとされる (Eriksson *et al.*, 1973; El-Kassaby *et al.*, 1984; Wheeler and Jech, 1992)。特に、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園は構成クローン数が 16 と非常に少ないため、より均

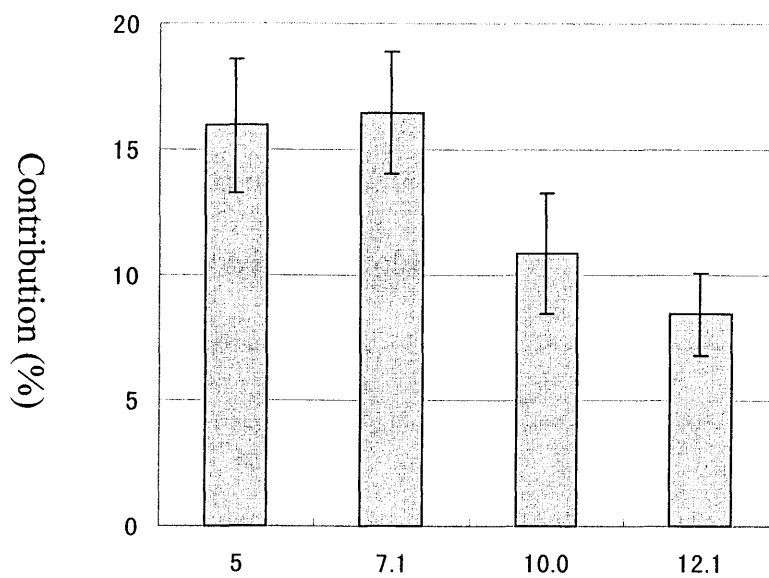


Fig 4.3-2 Distance and contribution rate between clones.

Seven clones were Namikata-(t)73, Tsuyazaki -(t)50, Misaki-(t)90, Ooseto-(t)12, Namikata-(t)37, Yasu-(t)37, and Sendai-(t)290. The height and length of bar showed the average and standard errors.

Table 4.3–7 Analysis of variance of contribution of orchard clones as the male–parent to the fertilizaition with the distance between clones.

Source of variance	SS	df	MS	F	<i>p</i>
Distance	837.05	3	279.02	2.72	< 0.05
Error	9652.88	94	102.69		
Total	10489.93	97			

Percentage of seedlings sired by each clone was arcsine transformed prior to analysis.

等な寄与が求められる。しかし、調査した 15 家系の実生苗では、各クローンの花粉親としての寄与は均等な状態とはかけ離れた実態となっており、少数の限定されたクローンがどの家系においても優占していることが明らかとなった。また、花粉親としての寄与が低いクローンも決まっており、採種園産実生苗の遺伝組成はごく限られた組合せとなっていることが判明した。

花粉親としての寄与率が 5 % 以上であった 7 クローンを花粉樹として、母樹クローンとの個体間距離と寄与率の関係を調べた結果、隣接した場合に高くなり、離れるにつれて低くなる傾向が認められた。また、分散分析の結果、寄与率には 5 % 水準で有意な差が認められた。採種園産実生苗に対する花粉親としての寄与率が最も高かった津屋崎ーク 50 号を例にとると、津屋崎ーク 50 号のすぐ隣に位置するクローンの家系別実生苗において、38.0 ~ 54.3 % と非常に高い寄与率となっている。九州地方のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園では、規則的な配置法であるギルティッヒ法 (Giertych, 1965) を用いている。この配置法では、各ラメートの周囲は常に同じクローンの組合せとなるため、結果的に、各クローンの花粉親としての寄与の均等化が妨げられていることになる。したがって、クローンの配置法については、各ラメートの周囲に配置されるクローンの組合せが異なるように改良する必要がある。

1996 年 4 ~ 5 月に各クローンの花粉飛散量を観察した結果、花粉親としての寄与率が著しく高かった津屋崎ーク 50 号や大瀬戸ーク 12 号は、花粉飛散量が多いことが観察された。逆に、寄与率が著しく低かった土佐清水ーク 63 号、志摩ーク 64 号、吉田ーク 2 号、田辺ーク 54 号などのクローンはほとんど花粉飛散が認められなかった。Schoen and Stewart (1986) は、White spruce の採種園において、各クローンの雄花数と交配寄与率の関係を調べ、一定のレベルまでは、雄花数の多いクローンほど交配寄与率が高くなったとした。本採種園においては、交配時期における各クローンの花粉飛散状況を観察することで、採種園産種苗全体に対する花粉親としての寄与の程度をある程度推測することができると考えられた。以上のことから、交配寄与率が著しく低いクローンに対しては、ジベレリンなどを用いた雄花の着花促進処理が必要であると考えられた。クロマツでは、GA₄₊₇ が雄花の着花促進に効果があることが認められており (金川, 1979; Kanekawa and Katsuta, 1982; 戸田ら, 1993)、事業的な適用が可能かどうか検討する必要がある。また、寄与率の著しく低いクローンの花粉を予め採取しておき、袋掛けしない雌花に人工的に交配する SMP (Supplemental Mass Pollination) 処理などもあわせて検討する必要がある。

採種園構成クローンの一つである小浜ーク 24 号は、雄花着花性が高く（九州地区林業試験研究連絡協議会育種部会, 1999）、花粉飛散量が多いことが観察されている。しかし、採種園産実生苗に対する小浜ーク 24 号の花粉親としての寄与率は 2.7 %であり、交配寄与率は任意交配を仮定した場合の期待値の半分以下であった。宮原ら（1998）は、1996 年に採種した福岡県の採種園産種子における小浜ーク 24 号の交配寄与率を PCR-SSCP 分析によって調査し、その寄与率が 3.1 %であったと報告した。1996 年に採取した種子を用いた宮原ら（1998）の結果と、1997 年に採取した種子を材料とした本結果とは非常によく一致しており、この現象が単年度だけのものではないことが明らかになった。この原因は、前述したように、小浜ーク 24 号の花粉飛散時期が他のクローンの受粉期から大きく遅れている（戸田ら, 1994a）ことによるものであると考えられ、採種園産実生苗に対するこのクローンの花粉親としての寄与はあまり期待できないと考えられた。

一方、個体間距離、花粉飛散量、開花期の一致性などの要因だけでは説明できない現象も認められた。例えば、大分ーク 8 号の自然交配実生苗は、その花粉親の 6 割以上が大瀬戸ーク 12 号であったが、大分ーク 8 号と大瀬戸ーク 12 号は隣接して配置されていなかった。また、小浜ーク 24 号を除く各クローンの交配期はほぼ同調していたことから、開花期の不一致が原因であるとも考えにくい。Apsit ら（1989）は、Douglas-fir 採種園を構成するクローンの中で、2つのクローンの等量混合花粉を 5 クローンの母樹に人工受粉させ、各クローンの交配成功率を調べた。その結果、母親と花粉親には特異的に交配能力の高い、あるいは低い組合せがあることを明らかにした。このような現象は、選択受精（Differential male Reproductive Success）と呼ばれ、Radiata pine などでも認められている（Moran and Griffin, 1985）。今回の結果が、このような選択受精現象によるものかどうかは不明であるが、もしクローン間に選択受精が存在するとすれば、ジベレリン処理や SMP 処理によって各クローンの花粉量を均等化したとしても、各クローンの寄与の均等化にはつながらないことになる。したがって、採種園構成クローン間で選択受精が存在するのか、また存在するとすれば交配に与える影響はどの程度であるのかを明らかにする必要がある。

第4節 次世代抵抗性に対する母親および花粉親としての寄与

4. 4. 1 はじめに

現在、マツノザイセンチュウ抵抗性事業では、採種園産種子から育成した実生苗にマツノザイセンチュウ(*Bursaphelenchus xylophilus*)を接種し、生存した苗を抵抗性マツとして供給している(鳥羽瀬ら, 1993; 戸田・寺田, 1997; 宮原, 1997)。したがって、事業の効率性を考えると、採種園構成クローンの中で母親として、あるいは花粉親として寄与した場合に、次世代集団のマツノザイセンチュウ抵抗性(以下、次世代抵抗性とする)が著しく低いクローンは採種園から除去すべきである。しかし、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園のクローン数は16と非常に少ないため、現段階ではこれ以上クローン数を少なくすることは望ましくない。林木育種センター九州育種場では、クロマツ(*Pinus thunbergii*)の新たな抵抗性クローンを選抜中である(戸田ら, 1998; 1999)。したがって、新たな抵抗性クローンが確定した後に、採種園をどのように改良すべきかについて検討しておく必要がある。

採種園構成クローンの次世代抵抗性への寄与は、家系別の自然交配実生苗に対するマツノザイセンチュウ接種試験によって明らかにされてきた(戸田ら, 1992; 戸田ら, 1993; 中野, 1995; 戸田ら, 1997b; 後藤・宮原, 2000; 川内, 2000)。最近では、抵抗性マツ特性表(九州地区林業試験研究機関連絡協議会育種部会, 1999)も完成し、九州地方の各研究機関におけるマツノザイセンチュウ接種結果をもとに、各クローンの次世代抵抗性への寄与について評価が行われている。一方、マツノザイセンチュウ抵抗性は、花粉親の影響を受けることがクロマツ×アカマツ(*Pinus densiflora*)の人工交雑種(戸田ら, 1990; 戸田ら, 1997a)、あるいはクロマツ×タイワンアカマツ(*Pinus massoniana*)の人工交雑種(石井ら, 1983; 栗延・藤沢, 1988)に対する接種試験によって明らかにされている。しかし、採種園構成クローンが花粉親となった場合の次世代抵抗性への寄与に関する報告はほとんど例がなく、緊急に明らかにする必要がある。

採種園構成クローンの花粉親としての次世代抵抗性への寄与を明らかにするためには、人工交配苗に対するマツノザイセンチュウ接種試験を行う必要がある。しかし、各地に造成されたマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園は、その一部がようやく成熟期に入ったところであり、これまで大規模な人工交配は行われていない。本研究では、RAPDマーカーを用いた採種園産実生苗の花粉親識別法を開発した。この方法を用いて家系別実生

苗の花粉親を識別すれば、人工交配を行わずに採種園構成クローンの花粉親としての次世代抵抗性への寄与を評価することが可能となる。

本節では、第4章第3節で花粉親を識別した家系別実生苗にマツノザイセンチュウを接種し、採種園構成クローンの母親および花粉親としての次世代抵抗性への寄与を評価した。

4. 4. 2 材料と方法

供試材料は、第3章第3節および第4章第3節で花粉親が1クローンに特定できた福岡県小郡市のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園（以下、福岡県採種園とする）から産出された15家系の自然交配実生苗634個体である。また、一般のクロマツ実生苗48個体を対照として用いた。1999年6月に、各個体にラベルを付けた後、一般クロマツを除く家系別実生苗からDNA分析用に針葉を採取した。1999年7月14日に、育種事業で用いているマツノザイセンチュウ島原個体群を剥皮接種法（戸田，1997）によって苗木1本当たり約6,000頭接種した。接種してから約1週間ごとに苗木の状態を観察し、最終的には接種から6ヶ月後の針葉の色によって苗木の生死を判定した。

供試した家系（母親）と花粉親によって各個体の接種結果を分類し、各交配組合せごとの接種数と生存数を調査した。また、採種園構成クローンが、母親として寄与した実生苗全体の接種生存率と花粉親として寄与した実生苗全体の接種生存率が同じ程度といえるかどうかについて、各クローンについてそれぞれ χ^2 乗検定を行った。

4. 4. 3 結果

接種して1ヶ月ほど経過してから、実生苗の一部に苗木の上部が赤く変色するものが認められた。一般クロマツは最も早い時期から変色が始まり、抵抗性家系の中では田辺ーク54号の実生苗が最も早く変色が始まった。接種してから4ヶ月ほど経過すると新たに変色が始まる個体はほとんど認められないようになり（Fig 4.4-1）、6ヶ月経過した時点では各個体の生存と枯死がはっきりと区別できた。

交配組合せごとの接種数と生存数、および各クローンが母親および花粉親として寄与した実生苗の接種生存率をTable 4.4-1に示す。採種園産実生苗全体では634個体中390個体が生存し、生存率は61.5%であった。一方、一般クロマツの生存率は22.9%であり、採種園産実生苗が明らかに高い抵抗性を示した。本研究で供試した材料の遺伝組成は、母親として15クローン、花粉親として17（16クローンと花粉汚染）の255組合せのいずれ



Before the inoculation tests.



After 4 months from the inoculation tests.

Fig 4.4-1 Artificial inoculation test of the pine-wood nematode to the open-pollinated half-sib progenies of Japanese black pine.

Table 4.4-1 Nematode-resistance in the F1 generation of each cross.

♀ \ ♂	Namikata Obama- -(t)73	Tosashimi zu-(t)63	Ooita -(t)8	Ei- (t)425	Tsuyaza ki-(t)50	Misaki -(t)90	Ooseto -(t)12	Namikata -(t)37	Tanabe -(t)54	Yasu -(t)37	Shima -(t)64	Yoshida -(t)2	Sendai -(t)290	Mitoyo -(t)103	Obama -(t)24	Contami- nation	Total Survival rate
Namikata-(t)73	-	-	2 (2)	-	2 (2)	6 (6)	6 (6)	-	4 (4)	4 (2)	-	-	9 (7)	-	-	1 (1)	34(30) 88.2
Obama-(t)30	2 (1)	-	1 (1)	-	6 (5)	5 (2)	9 (4)	4 (1)	-	5 (1)	1 (1)	1 (0)	8 (2)	-	-	1 (0)	43(18) 41.9
Tosashimizu-(t)63	3 (3)	1 (1)	1 (0)	2 (2)	2 (2)	1 (1)	12 (6)	4 (2)	-	-	-	1 (0)	12 (8)	-	3 (3)	-	42(28) 66.7
Ooita-(t)8	1 (1)	-	-	-	1 (0)	1 (1)	25(18)	8 (5)	-	-	-	-	-	-	-	1 (0)	37(25) 67.6
Ei-(t)425	3 (2)	-	-	-	16(13)	5 (4)	4 (2)	6 (3)	-	-	-	1 (1)	4 (4)	-	1 (0)	1 (0)	41(29) 70.7
Tsuyazaki-(t)50	8 (6)	-	3 (3)	-	1 (1)	9 (6)	3 (2)	2 (2)	2 (1)	-	-	-	7 (5)	-	3 (2)	1 (0)	39(28) 71.8
Misaki-(t)90	1 (1)	1 (1)	-	1 (0)	-	20(13)	3 (3)	5 (4)	1 (1)	1 (0)	-	-	2 (0)	-	3 (2)	2 (1)	40(26) 65.0
Ooseto-(t)12	3 (3)	2 (0)	2 (1)	-	5 (3)	3 (2)	-	6 (4)	-	7 (1)	-	-	5 (1)	-	1 (0)	1 (0)	37(17) 45.9
Namikata-(t)37	1 (1)	1 (1)	-	3 (1)	10(10)	1 (1)	7 (7)	2 (1)	1 (1)	4 (2)	-	-	10 (5)	-	2 (0)	2 (1)	44(31) 70.5
Tanabe-(t)54	-	3 (0)	-	1 (1)	23 (4)	4 (2)	5 (1)	24(14)	1 (0)	9 (2)	-	-	10 (3)	-	-	2 (0)	82(27) 32.9
Yasu-(t)37	1 (0)	-	-	1 (1)	26(20)	7 (6)	1 (0)	3 (2)	-	-	-	-	-	-	1 (0)	2 (0)	42(29) 69.0
Shima-(t)64	4 (4)	-	-	1 (1)	25(18)	3 (1)	-	1 (0)	1 (0)	1 (1)	-	-	5 (2)	-	1 (1)	-	43(29) 67.4
Yoshida-(t)2	-	-	-	2 (2)	8 (8)	8 (7)	9 (7)	6 (6)	-	-	-	-	6 (3)	-	2 (1)	1 (1)	43(36) 83.7
Sendai-(t)290	-	1 (1)	-	1 (1)	4 (3)	10 (3)	8 (5)	7 (4)	-	1 (0)	-	-	-	-	1 (1)	-	34(19) 55.9
Mitoyo-(t)103	1 (1)	-	-	-	16(11)	3 (2)	6 (2)	8 (3)	1 (0)	1 (1)	-	-	1 (0)	-	2 (2)	1 (0)	40(22) 55.0
Total	28(23)	9 (4)	5 (5)	13(10)	9 (7)	164(112)	98(63)	86(51)	11 (7)	33(10)	1 (1)	3 (1)	79(40)	-	20(12)	16 (4)	634(390) 61.5
Survival rate	82.1	44.4	100.0	76.9	77.8	68.3	66.7	64.3	59.3	63.6	30.3	100.0	33.3	50.6	60.0	25.0	61.5

The number of seedlings used for the inoculation test of the pinewood nematode.
The number of seedlings survived through the inoculation test (parenthetically)

かである。このうち、実際に接種したのは 145 組合せであり、接種数が 10 以上あったものは 14 組合せであった。これらの 14 組合せにおける生存率は、田辺ーク 54 号×津屋崎ーク 50 号の 17 %から波方ーク 37 号×津屋崎ーク 50 号の 100 %の範囲であった。

採種園構成クローンが母親として寄与した実生苗全体の接種生存率と花粉親として寄与した実生苗全体の接種生存率を Fig 4.4-2 に示した。採種園構成クローンが母親として寄与した実生苗の接種生存率は、田辺ーク 54 号の 33 %から波方ーク 73 号の 88 %の範囲であった。花粉親としての接種数が 20 個体以上あったのは、波方ーク 73 号、津屋崎ーク 50 号、三崎ーク 90 号、大瀬戸ーク 12 号、波方ーク 37 号、川内ーク 290 号、小浜ーク 24 号の 8 クローンであった。これらのクローンが花粉親となった場合の実生苗の接種生存率は、夜須ーク 37 号の 30 %から波方ーク 73 号の 82 %の範囲であった。これらの 8 クローンのうち、充実種子が得られなかった小浜ーク 24 号を除く 7 クローンについて、各クローンが母親として寄与した実生苗の生存数と枯死数の割合と、花粉親として寄与した実生苗の生存数と枯死数の割合を比較した結果、5 クローンでは有意な差がなかった。一方、大瀬戸ーク 12 号は 5 %水準で、夜須ーク 37 号は 0.1 %水準で有意な差が認められた (Table 4.4-2)。特に、夜須ーク 37 号は、母親として寄与した実生苗の接種生存率は 69 %と平均よりも高いが、花粉親として寄与した実生苗の接種生存率は 30 %と著しく低かった。

4. 4. 4 考察

本研究では、家系別実生苗の花粉親を RAPD マーカーを用いて識別し、その実生苗にマツノザイセンチュウ接種試験を行うことにより、採種園構成クローンの次世代抵抗性への寄与を母親および花粉親としての両面から評価した。これまで、花粉親としての次世代抵抗性への寄与を評価した例はほとんどなく、今回の結果は採種園を遺伝的に改良する上で重要なデータになると考えられる。また、この方法を適用することで、人工交配にかかる時間、労力、コストを解消できた。しかし、交配様式が著しく均等な状態から偏っていたために、花粉親として寄与した実生苗の合計数が 20 個体に満たないものが 8 クローン認められた。これらのクローンに関する花粉親としての次世代抵抗性への寄与の評価は、今後の課題である。

接種数が 10 個体以上あった 14 組合せの中で、交配組合せごとの接種生存率を比較した結果、田辺ーク 54 号×津屋崎の組合せでは 17 %と非常に低かったが、波方ーク 37 号×津屋崎ーク 50 号では 100 %と高かった。津屋崎ーク 50 号が花粉親として寄与した実生苗

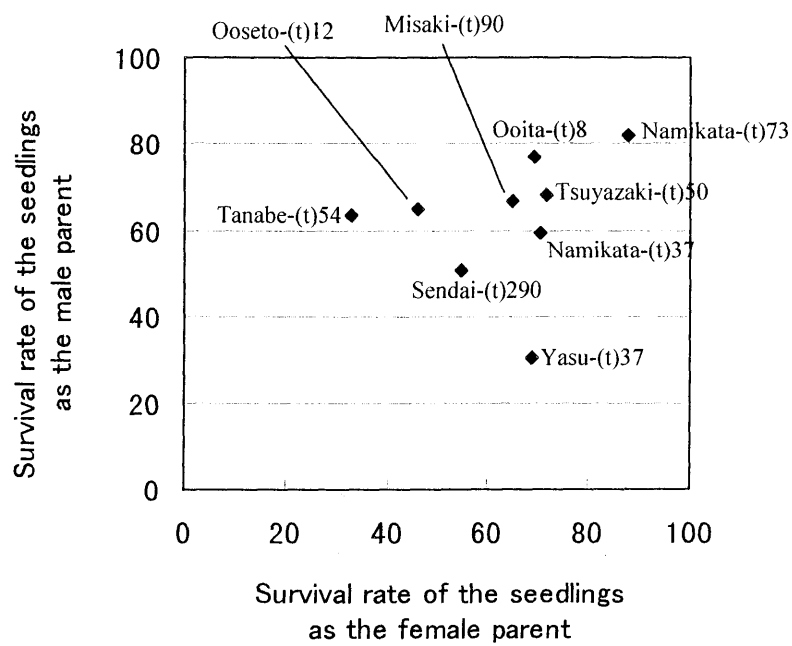


Fig 4.4-2 Survival rate of the progenies through the inoculation tests of the nematode.

The clones were not shown in this figure, if the number of seedlings as the male parent used for the inoculation tests was less than 10.

**Table 4.4–2 Difference of the survival rate between
as the female and the male parent.**

Clone	Female parent ^a		Male parent ^b		χ^2	<i>p</i>
	Survived	Dead	Survived	Dead		
Namikata–(t)73	29	4	23	5	0.40	0.5290
Tsuyazaki–(t)50	28	11	112	52	0.18	0.6709
Misaki–(t)90	26	14	44	22	0.03	0.8606
Ooseto–(t)12*	17	20	63	34	4.02	0.0450
Namikata–(t)37	31	13	51	35	1.55	1.5544
Yasu–(t)37***	29	13	10	23	11.11	0.0009
Sendai–(t)290	18	15	38	37	0.14	0.7102

Female parent^a: When the clone was the female parent, survived and dead seedlings were counted after 6 months from the inoculation tests.

Male parent^b: When the clone was the male parent, survived and dead seedlings were counted after 6 months from the inoculation tests.

An asterisk indicates a significant deviation from the expected value.

Marks (*, **, ***) shows the significance at 0.05, 0.01 and 0.001 levels.

全体の接種生存率は 68 %であったことから、特定の組合せとなった場合に抵抗性が向上する、もしくは低下する可能性が示唆された。将来的には、非常に高い抵抗性を持ち、接種生存率が 90 %以上となるような組合せが見つければ、接種検定を行わずに抵抗性種苗を供給することも可能となる。このような強い抵抗性を持つ組合せの検出は、今後の課題である。しかし、母親としても花粉親としても次世代抵抗性への寄与が高かった波方ーク 73 号を中心とした組合せは有望であると考えられる。

各クローンが母親として寄与した実生苗全体の接種生存率では、田辺ーク 54 号が 33 %と特に低かった。田辺ーク 54 号の実生苗は、従来の報告でもマツノザイセンチュウ抵抗性が低いとされている（中野, 1995; 九州地区林業試験研究機関連絡協議会, 1999; 後藤・宮原, 2000; 川内, 2000）。また、田辺ーク 54 号実生苗は、苗木の成長が悪く、床替え時の活着率や得苗率も低いことが指摘されている（中野, 1995; 後藤・宮原, 2000; 川内, 2000）。したがって、田辺ーク 54 号は、現在選抜中である新たな抵抗性クローン（戸田ら, 1998, 1999）が確定した後、そのクローンと置き換えて採種園から除去する必要があると考えられた。また、本章第 2 節では、田辺ーク 54 号の種子が採種園産種子の 40 %以上を占めていることが明らかになった。したがって、育種事業の生産効率を向上させるには、このクローンの球果採取量を制限する必要があることが明らかとなった。

花粉親として寄与した実生数が多かった 7 クローンについて、各クローンが母親となった場合と花粉親となった場合の次世代抵抗性への寄与を比較した結果、大瀬戸ーク 12 号と夜須ーク 37 号の 2 クローンが有意に異なっていた。特に、夜須ーク 37 号は、母親となった場合と花粉親となった場合の差が大きく、0.1 %水準で有意な差が認められた。戸田ら（1990）は、クロマツ 7 系統の自然交配苗とクロマツ×アカマツ抵抗性クローンの人工交雑種にマツノザイセンチュウ接種試験を行い、平均健全率がクロマツ自然交配苗で 28 %であったのに対して、人工交雑種では 75 %に向上したとした。また、戸田ら（1997a）は、クロマツ抵抗性 5 家系の自然交配苗とクロマツ×アカマツ抵抗性クローンの人工交雑種に対してマツノザイセンチュウ接種試験を行い、自然交配苗では平均生存率が 65 %であったのに対して、人工交雑種では 95 %に向上したとした。また、石井ら（1983）は、クロマツ精英樹 7 系統、タイワンアカマツ 1 系統、クロマツ×タイワンアカマツ 5 系統にマツノザイセンチュウ接種試験を行い、平均生存率がそれぞれ 12、96、76 %であったとした。したがって、次世代抵抗性は、抵抗性の強い花粉親によって引き上げられると考えられる。夜須ーク 37 号の自然交配実生苗の遺伝組成を検討した結果、供試した 42 個体中 26

個体（62 %）は津屋崎ーク 50 号が花粉親となっていた。津屋崎ーク 50 号が花粉親として寄与した実生苗全体の接種生存率は 68 % と高かった。一方、花粉親としての夜須ーク 37 号は、比較的均等に各家系に寄与していた。したがって、夜須ーク 37 号が母親として寄与した実生苗全体の接種生存率は、夜須ーク 37 号の本来の抵抗性よりも、その主な花粉親である津屋崎ーク 50 号によって引き上げられていることが推察された。以上のことから、任意交配から著しく偏った交配様式となっている場合、各家系の自然交配苗に対する次代検定では、そのクローンの正確な評価ができない可能性が示された。

花粉汚染は採種園産種子の遺伝的価値を著しく減退させるため（Di-Giovanni and Kevan, 1991）、花粉汚染率の実態調査が Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) の採種園（Adams *et al.*, 1997）、Scots pine (*Pinus sylvestris*) の採種園（Nagasaka and Szmidt, 1985; El-Kassaby *et al.*, 1989; Harju and Muona, 1989; Wang *et al.*, 1991）、Loblolly pine (*Pinus taeda*) の採種園などで行われている。これらの実態調査では、種子を材料として用いており、花粉汚染によって生じた種苗の遺伝的性質に関する報告はほとんどみられない。本研究では、花粉汚染による実生苗 16 個体にマツノザイセンチュウ接種を行った結果、生存したものは 4 個体のみであり、接種生存率は 25 % であった。採種園産実生苗全体の生存率が 62 % であったのに対して、花粉汚染によって生じた実生苗の生存率は非常に低く、対照として用いた一般クロマツの生存率に 23 % に近い値であった。以上のことから、採種園において花粉汚染を防ぐことは、採種園種苗の抵抗性を高く保つためにも重要であることが示された。

抵抗性クローンの一つである小浜ーク 24 号は、クロマツ×アカマツの雑種クローンであることが判明し（渡辺ら, 1996）、抵抗性クロマツ採種園における取り扱いが検討されていた。小浜ーク 24 号の自然交配実生苗の抵抗性は比較的高く（宮原ら, 1994; 戸田ら, 1997）、このクローンが花粉親となった場合の実生苗、つまり戻し交雑種のマツノザイセンチュウ抵抗性が注目されていた（宮原ら, 1998）。本節では、小浜ーク 24 号が花粉親として寄与した実生苗は合計 20 個体であり、接種生存率は 60 % であった。この値は、他の抵抗性家系と同程度であった。前述したように、台湾アカマツはマツノザイセンチュウ抵抗性が高く、クロマツ×台湾アカマツの交雑種も高い抵抗性を示す。しかし、この戻し交雑種のマツノザイセンチュウ抵抗性は、母親であるクロマツと同程度に低下することが知られている。石井ら（1983）は、76 % の接種生存率を示したクロマツ×台湾アカマツの戻し交雑種にマツノザイセンチュウ接種試験を行った結果、その生存率は 12 % に低下したとしている。また、栗延・藤沢（1988）は、クロマツ精英樹 18 系統、クロ

マツ×タイワンアカマツ 10 系統、戻し交雑種 14 系統に対して、マツノザイセンチュウ接種試験を行い、その健全率がそれぞれ 13、61、35 %であったとしている。本研究の結果は、戻し交雑種の抵抗性が母親であるクロマツと同程度に低くなるというこれらの報告と一致していた。これまで、雑種クローンである小浜ーク 24 号のクロマツ採種園における利用が検討されてきたが、小浜ーク 24 号種子の充実率は著しく低く母親としての種子生産への寄与が望めないこと（宮原ら, 1998; 川内, 2000）、花粉親としての交配寄与率は期待値の半分程度であること（宮原ら, 1998; 第 4 章第 3 節）、戻し交雑種の抵抗性は他のクロマツ家系と同程度であることなどから、このクローンのマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園における利用価値は低いと考えられた。

以上のように、RAPD マーカーを用いた花粉親識別を行い、遺伝組成を明らかにした実生苗にマツノザイセンチュウ接種試験をすることにより、多くの知見を得ることができた。この方法は、過去に設定された採種園産の家系別試験林にも適用することが可能である。つまり、家系別試験林の花粉親を RAPD マーカーを用いて識別することにより、どのような組合せが残存しているかを明らかにすることができる。この情報により、マツノザイセンチュウ抵抗性だけでなく、その他の病虫害に対する抵抗性や耐潮性なども明らかにできる。

第5節 結論

本章では、採種園構成クローンの母親および花粉親としての種子生産性および次世代抵抗性への寄与に関する遺伝的評価を行った。

第2節では、採種園構成クローンの採種園産種子に対する母親としての寄与の程度を評価した。1 ラメート当たりの球果数と1 球果当たりの充実種子数は、0.1 %水準でクローン間に有意な差が認められた。これらの値から算定した1 ラメート当たりの充実種子数はクローンによって大きく異なっており、最大の田辺ーク 54 号では最小の土佐清水ーク 63 号の100 倍近い値となっていた。また、ラメートの枯死率もクローンによって大きく異なっており、接ぎ木不親和とマツノザイセンチュウ病が主な枯死原因となっていた。採種園産種子に占める各クローン種子の構成割合を調べた結果、田辺ーク 54 号の種子がその40 %以上を優占していることが判明した。したがって、採種園産種子における各クローン種子の割合を均等化するには、クローンごとに球果採取量やラメート数を調整する必要があることが明らかとなった。また、クロマツ雌花の着花促進技術を開発する必要があると考えられた。

第3節では、第2章第4節で開発した田辺ーク 54 号の自然交配実生苗に対する花粉親識別法を他の家系に応用して、採種園構成クローンの採種園産実生苗に対する花粉親としての寄与の程度を評価した。合計で45 個のマーカーを用いて、家系別実生苗648 個体の花粉親を識別した結果、14 家系全体で86.3 %の実生苗の花粉親を識別することができ、採種園産実生苗の花粉親識別に対するRAPD マーカーの有効性を実証できた。本採種園において、明らかにされた自殖率は1.5 %、花粉汚染率は2.2 %といずれも低い値であり、自殖および花粉汚染の影響は少ないと考えられた。各家系について、上位4 クローンと下位4 クローンのクローンの組合せを比較した結果、少数の限定されたクローンの組合せがどの家系においても花粉親として優占していることが示された。また、逆に、いくつかのクローンは常に花粉親としてほとんど寄与しておらず、採種園産実生苗はごく限られた交配組合せが優占していることが明らかとなった。花粉親としての寄与率とクローン間の距離を比較した結果、隣接したクローン間での寄与率が高くなっていることが判明し、規則的な配置は花粉親としての寄与の均等化を妨げていることが示された。また、交配時期の観察結果から、花粉飛散がほとんど認められなかったクローンは、花粉親としての寄与率が著しく低いことが明らかとなった。したがって、花粉親としての寄与が著しく低いクロ

ーンについて、GA₄₊₇ 処理などの雄花の着花促進処理や、補完的な人工交配などを行い、各クローンの花粉親としての寄与の均等化を図る必要があることが示された。

第4節では、母親と花粉親としての両面から各クローンの次世代抵抗性への寄与を評価した。花粉親を識別した実生苗にマツノザイセンチュウ接種試験を行うことにより、人工交配をすることなく、採種園構成クローンの花粉親としての寄与を評価することができた。各クローンが母親として寄与した実生苗の接種生存率は 32.9 ～ 87.9 %、花粉親として寄与した実生苗の接種生存率は 30.3 ～ 82.1 %の範囲であった。特に、田辺ーク 54 号は、種子生産性が高く、採種園種子の 4 割以上を占めるにもかかわらず、母親としての次世代抵抗性への寄与が極端に低く、採種園種苗の生産効率を低下させていることが判明した。また、夜須ーク 37 号は、母親としては中程度の抵抗性を示したが、花粉親としての抵抗性は非常に低かった。夜須ーク 37 号の自然交配実生苗は、その花粉親の 6 割以上が津屋崎ーク 50 号であった。津屋崎ーク 50 号は花粉親としての次世代抵抗性への寄与が高かったため、夜須ーク 37 号の自然交配苗の抵抗性が本来のものよりも引き上げられていることが推察された。したがって、交配様式が偏っている場合、自然交配苗に対する次代検定ではそのクローンの正当な評価ができない可能性が示された。また、花粉汚染によって生じた実生苗の生存率は一般苗と同程度に低く、花粉汚染による実生苗の遺伝的品質の低下が確認された。雑種クローンである小浜ーク 24 号の花粉親としての次世代抵抗性への寄与が注目されていたが、今回の結果では他の抵抗性クロマツ家系と同程度であり、採種園におけるこのクローンの利用価値は低いことが示された。

第5章 総合考察

1. 採種園の遺伝子管理における RAPD マーカーの有効性

RAPD マーカーは操作が簡便で、比較的安価な設備で実験可能であるため (Waugh and Powell, 1992; 後藤ら, 2000)、多くの研究室で用いられている (Williams *et al.*, 1990)。本研究では、採種園の遺伝子管理を行うために、この RAPD マーカーを用いた採種園構成クローンの識別法および採種園産種苗の花粉親識別法の開発を試みた。

本研究で対象としたマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園を構成する 16 クローンは、我が国の西日本地域という限定された地域から選抜されており、これらのクローン間で十分に多型的なマーカーが取得できるかが本研究の一つの課題であった。探索の結果、10 個のマーカーが取得でき、これらの表現型によって 16 クローンを互いに識別することができた。また、異なる場所に植栽された同一クローンのラメートは全く同じ表現型を示し、取得したマーカーは生育環境の影響によるクローン内の変異を生じなかった。したがって、RAPD マーカーは、Bailey (1983) が提唱するクローン識別の基準を満たしており、採種園構成クローンの識別に有効であることが示された。

一方、RAPD マーカーの再現性を疑問視する声もあり (Penner *et al.*, 1993)、信頼性の高いクローン識別技術を確立する必要があることがあった。RAPD マーカーの再現性は、使用するフラグメントによって異なることが指摘されている (Skroch and Nienhuis, 1995)。5 回の PCR 反応による再現性テストは、ハゼノキ (*Rhus succedanea*) (後藤ら, 1997) とスギ (*Cryptomeria japonica*) (後藤ら, 1999) の品種識別において、再現性の高いマーカーを選抜するのに有効であった。本研究では、この方法を利用して PCR 間の比較を行い、再現性の高い 10 個のマーカーを取得することができた。マーカーの再現性を検討する方法としては、複数のラメート間で比較する方法もあるが、増幅された全てのフラグメントがラメート間で一致することが多く (Koller *et al.*, 1993; Keil and Griffin, 1994; Van de Ven and McNicol, 1995; Scheepers *et al.*, 1997)、再現性の低いフラグメントを排除するという目的には向かないと考えられる。Penner ら (1993) は、異なる研究室ではマーカーの表現型が異なることがあると指摘している。しかし、本研究で取得した RAPD マーカーは、異なる研究室でも全く同一の表現型を示した。このように高い再現性を示した要因としては、1) 明瞭度が高いこと、2) 有無が明瞭に判別でき、紛らわしい他のフラグメントが付近にないこと、3) マーカーのサイズが中程度であること、などが考えられた。

採種園は非常に多数の個体で構成されているため、各個体から個別に DNA 抽出と RAPD 分析を行うには莫大な時間、労力、コストがかかる。特に、複雑な工程の多い DNA 抽出作業は時間がかかるため、現実的に処理できるサンプル数には限界がある。そこで、本研究では、異なる複数のサンプルを混合して一度に DNA 抽出と RAPD 分析を行うクローン識別の簡便化法として、バルク法 (Michelmore *et al.*, 1991; Yu and Pauls, 1993) を採種園構成個体の遺伝子管理に応用した。2つのクローンの針葉を 3 : 1 の割合で人為的に混合した混合サンプルを用いて RAPD 分析を行った結果、単一クローンの場合とは異なる表現型を示し、全体の 4 分の 1 の量混入したクローンの存在が検出できた。そこで、福岡県採種園を構成する 157 個体について、植栽位置図に同じクローン名が記載された 4 個体を等量混合したサンプルを調製し、その表現型を調査した結果、個別に分析する場合の約 3 分の 1 の実験量で全個体のクローン識別が可能であった。混合する個体数については検討の余地があるが、Michelmore ら (1991) の結果から考察すると、一度に混合する個体数は 5 個体程度までが適当ではないかと考えられる。

これまで採種園産種苗の花粉親識別にはアイソザイムマーカーが用いられてきたが、用いる酵素種が限られるため、構成クローンの採種園産種苗に対する花粉親としての寄与の程度を知ることが容易でなかった (Rudin and Lindgren, 1977)。本研究では、採種園産種苗の花粉親識別に対して、マーカー数を容易に増やすことのできる RAPD マーカーを初めて利用した。RAPD マーカーを用いた種子親および花粉親の識別は、Welsh ら (1991) や Scott ら (1992) によって既に提唱されている。しかし、RAPD マーカーは優性マーカーであるため、両親の識別を行うために必要な情報が十分に得られず、人工交配苗の親の確認 (Åkerman *et al.*, 1995) など、ごく限られた数の候補の中から親を決定するような場合にのみ有効であると考えられてきた。

針葉樹は、倍数体である針葉と半数体である雌性配偶体の 2 つのタイプの DNA を持つことが知られている (Bartels, 1971)。近年、親個体の保有する RAPD マーカーが半数体である雌性配偶体にメンデルの法則に従って遺伝することが明らかにされた (Tulsieram *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1995)。本研究では、このことを利用して、各クローン 10 個の雌性配偶体を分析することにより、取得した全てのマーカーについて採種園構成クローンの遺伝子型を決定した。3 組合せの人工交配苗を用いて RAPD 分析した結果、この方法で決定された各クローンの遺伝子型は正確であることが明らかとなった。そこで、福岡県採種園から産出された田辺ーク 54 号実生苗 85 個体の表現型と構成クローン

の遺伝子型と比較して各実生苗の花粉親を識別した結果、96.5 %に相当する 82 個体の花粉親を識別することができた。

本研究で示した採種園産種苗の花粉親識別法は、理論的には他の針葉樹採種園においても応用可能である。しかし、花粉親の候補数、すなわち採種園を構成するクローン数が多くなるほど、花粉親の識別に必要なマーカーの数は多くなり、マーカーの探索と遺伝子型の決定にかかる労力は大きくなると予想される。本研究で対象とした採種園を構成するクローン数は 16 と少ないにもかかわらず、ほぼ完全な花粉親識別を行うのには 28 個のマーカーが必要であった。我が国の精英樹採種園で用いられるクローン数は、25 あるいは 49 が多い（大庭・勝田, 1991）。本研究の結果から推察すると、RAPD マーカーによる花粉親識別法が適用できるのは、25 クローン程度までが現実的であろうと考えられる。また、本研究で開発した花粉親識別法は、採種園における利用だけにとどまらず、針葉樹天然林における交配様式の解明にも有効である。この場合にも、花粉親の候補数が非常に多い林分では、その適用には限界があり、例えば孤立集団の個体間の遺伝子交流をモニタリングするような場合に、特に有用であると考えられる。

2. 採種園における交配様式

クローン採種園では、同一クローンのラメートが複数存在するため、天然林に比べて自殖が発生する機会が多いと考えられていた（Fast *et al.*, 1986; Barrett *et al.*, 1987）。針葉樹のほとんどは他殖性であるため、自殖が発生すると球果数や充実種子数が極端に減少し、さらに実生苗の初期段階での枯死率が高くなることが知られている（Hadders and Koski, 1975）。採種園における自殖率の推定には、多くの場合、採種園から産出された充実種子を材料として用いている。報告されている自殖率の多くは 5 % 程度（Rudin and Lindgren, 1977; Shen *et al.*, 1981; Ritland and El-Kassaby, 1985; Rudin *et al.*, 1986）であり、天然林と変わらないレベルであった。本研究では、床替え後の実生苗を材料として自殖率を求めた結果、1.5 % 程度とこれらの報告に比べてさらに低い値であった。採種園では、苗木生産の段階で自殖種子あるいは自殖苗は選択的に排除されるため、多くの場合、採種園産の実生苗に占める自殖苗の割合は自然と少なくなると考えられる（古越, 1978）。これまで採種園で調査された自殖率の結果と本研究の結果はこの説を支持しており、多くの採種園では、自殖が採種園産実生苗の遺伝的品質に与える影響は小さいと考えられる。しかし、自殖の発生が種子生産にどの程度影響を与えているかについては、本研究のデータからは明

らかにすることはできなかった。

採種園における花粉汚染については、採種園種子の遺伝的品質を著しく減退させるため、採種園管理上の大きな問題となっている (Di-Giovanni and Kevan, 1991)。しかし、多くの採種園では 20 %を超える深刻なレベルでの花粉汚染率が発生している (Nagasaka and Szmidt, 1985; Friedman and Adams, 1985; Fast *et al.*, 1986; Harju and Muona, 1989; Wang *et al.*, 1991)。本研究で観察された花粉汚染率は 2.2 %と低く、問題ないレベルであると考えられた。これは、対象とした福岡県採種園の周囲 500m にはマツが存在せず、花粉汚染源がないことが主な要因であると考えられた。したがって、クロマツの場合、500m 程度の花粉隔離帯の設置は有効であると考えられる。しかし、我が国の西日本地域の場合、マツノザイセンチュウ病によりマツの自然林が過去に壊滅的な被害を受けているという特殊な状況であるため、この結果が、例えばスギやヒノキの採種園にそのまま適用できるとは考えにくい。花粉汚染の約 8 割は周囲の自然林に由来していたとの報告もあり (Adams *et al.*, 1997)、採種園の周囲の状況によって花粉汚染の実態は異なると考えられる。

本研究では、充実種子の得られた全ての家系で花粉親を識別し、全体では 87.6 %の個体の花粉親を識別することができ、多くの家系では任意交配からかけ離れた実態となっていることを明らかにした。このように、採種園の全家系を対象とした花粉親の識別はこれまで例がなく、採種園における交配実態の全貌を初めて明らかにしたという点で本研究の新規性は高い。Shen ら (1981) は隣接する個体間の交配寄与率が著しく高くなるとしたが、本研究でも個体間の距離によって花粉親としての寄与率が異なるという結果が得られた。また、Schoen and Stewart (1986) は、一定のレベルまでは、雄花数が多くなるにつれてそのクローンの交配寄与率は向上するとした。本研究でも、交配時期の観察結果から、花粉飛散量の少なかったクローンの花粉親としての寄与が低いことが明らかとなった。また、開花期の一致性は、交配様式に影響を与えることが知られている (El-Kassaby *et al.*, 1988; Erickson and Adams, 1989)。本研究でも、他の抵抗性クローンの雌花の受粉期から雄花の飛散時期が大きく遅れる小浜ーク 24 号の花粉寄与率は 2.7 %とであり、宮原ら (1998) の報告と同様に、任意交配を仮定した場合の期待値の半分以下であった。

一方、これらの要因だけでは説明できない現象も見られた。例えば、大分ーク 8 号の自然交配実生苗の花粉親は、約 6 割が大瀬戸ーク 12 号であったが、これらのクローンは隣接して存在していなかった。近年、Moran and Griffin (1985) は *Radiata pine* (*Pinus radiata*) で、Apsit ら (1989) は *Douglas-fir* (*Pseudotsuga menziesii*) で、特定のクローンの花粉が

選択的に受精授かる選択受精(Differential Male Reproductive Success)現象を報告している。しかし、我が国のスギ(大庭, 1972)やヒノキ(清藤ら, 2000b)で行われた研究では、この選択受精現象は認められていない。もし、採種園を構成するクローン間で選択受精が発生するとすれば、ジベレリン処理や SMP 処理を行って各クローンの花粉量を均等化しても任意交配にはつながらないことになる。マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園において、特定クローンの選択受精が起こっているかどうか、あるいは起こっているとすればその影響はどの程度かを明らかにすることは、遺伝子管理を行う上で非常に重要である。これまでの選択受精に関する研究では、特異的な変異を持つクローンを指標にして行われるものがほとんどであった。しかし、本研究で開発した花粉親識別技術を用いることにより、例えば、5 クローンの混合花粉を用いて人工交配した場合に、それぞれのクローンの交配寄与率がどのように変動するかなどを詳細に調べることができる。林木の場合、選択受精に関する報告は少なく、その機構解明にむけた研究は育種学のみならず遺伝学的にも意義が大きい。

3. 採種園における遺伝子管理についての具体的提案

ここでは、研究対象とした福岡県のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園において、本研究で得られた結果をもとに考察された遺伝子管理に関する具体的な提案について述べる。

1) 当面の措置

マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園ではクローン数が 16 と非常に少ないため、これ以上クローン数を少なくすることは望ましくないと考えられる。また、マツノザイセンチュウに対する抵抗性の生理機構や遺伝様式が十分に解明されていないこと、さらに各クローンの実生後代における他の病虫害あるいは潮風などに対する抵抗性が不明であることなどを考えると、現段階ではこれら 16 クローンができる限り次世代に均等に寄与し、少しでも遺伝的に多様な集団にする措置が必要であると考えられる。

本研究では、採種園産種子における各クローン種子の構成割合を調べた。その結果、各クローンの構成割合は均等な状態となっておらず、田辺一ク 54 号の種子が 40 %を超えて優占していることが判明した。種子生産量が需要量を上回っている採種園では、各クローンの種子生産量になるべく均等になるように、クローンごとに調整して球果を採種するの

が1つの対応策である。しかし、種子生産量の不十分な採種園では全ての種子を取らざるを得ない。採種園種子に占める各クローン種子の構成割合が不均等になったのには、大きな2つの原因があった。1つの原因は、各クローンの種子生産能力であり、最少の土佐清水ーク63号と最大の田辺ーク54号では充実種子生産量に100倍近い差があった。このような種子生産能力の違いは、主に個体当たりの球果着生数の差に起因していた。雌花着花性や種子生産性は遺伝的な形質と考えられており（勝田, 1982; 戸田ら, 1993）、著しく種子生産量の低かったクローンに対しては雌花の着花促進処理を行う必要がある。もう一つの原因は、クローンによるラメートの枯死率の違いであり、波方ーク73号や三豊ーク103号では接ぎ木不親和が原因と見られる枯死が多発していた。これらのクローンでは、台木を選択する際に自らの家系後代を用いる（Slee and Spidy, 1970）などの工夫をする必要がある。また、挿し木（石松, 1998; 後藤, 1999）、組織培養（石井, 1993; 後藤・宮原, 1997; 三樹, 1998）などの接ぎ木以外のクローン増殖法も検討されるべきである。

採種園において任意交配が実現していると仮定すると、各クローンの花粉親としての寄与率は1/16（6.25 %）となる。しかし、採種園産実生苗の花粉親を識別した結果、常に同じクローンの組合せが花粉親として優占している反面、いくつかのクローンはどの家系においてもほとんど寄与していないことが明らかとなった。したがって、採種園産種苗の遺伝組成は、ごく限られた組合せが優占していることが判明した。スギおよびヒノキ採種園では、ジベレリン GA₃ による雄花の着花促進処理を行うことにより、各クローンの寄与の均等化が図れるとされている（金川・桑原, 1984; 金川・北川, 1987）。クロマツの場合、スギやヒノキのようにジベレリンによる劇的な効果は認められていないが、極性の低い GA₄₊₇ を用いることにより、雄花の着花促進効果がある程度認められており（金川, 1979; Kanekawa and Katsuta, 1982; 戸田ら, 1993）、事業的な利用が可能かどうか検討する必要がある。さらに、寄与率の低いクローンの花粉を予め集めておき、袋掛けをしない雌花に補完的な人工交配を行う SMP (Supplemental Mass Pollination) 処理も検討する価値がある。その場合、El-Kassaby ら（1993）が指摘しているように、花粉を交配する時期、回数などについて十分に検討する必要がある。また、アカマツでは、サイトカイニン（BAP）処理することにより、雄花を雌花に誘導できることが報告されている（Wakushima *et al.*, 1996; 1997）。津屋崎ーク50号のように花粉親としての寄与率は著しく高いが雌花の着花性が著しく低いようなクローンには、この BAP 処理は試みる価値があると考えられる。

本研究では、Shen ら（1981）や Prat（1995）の報告と同様に、隣接した個体間の交配寄

与率が高くなる現象が認められた。九州地方のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園では、規則的な配置法 (Giertych, 1965) が採用されている。この方法では、各クローンのラメートの周囲には常に同じクローンの組合せが存在する。したがって、交配寄与の均等化を行うためには、各ラメートの周囲を構成するクローンの組合せが異なる配置の方が望ましいことが明らかとなった。

また、採種園クローンの土佐清水ーク 63 号と吉田ーク 2 号の 2 クローンは、母親としても花粉親としても採種園産種子に対する寄与度が著しく低かった。このようなクローンは、着花促進処理だけではなく、ラメート数を増やすという対応も必要であると考えられる。その場合、クローン配置が不規則になることが予想され、同一クローンがなるべく遠い距離に配置されるように調整する必要がある。

2) 将来的な対応

林木育種センター九州育種場では、クロマツの新たな抵抗性クローンを選抜中であり、近く確定する見込みである (戸田ら, 1998; 1999)。したがって、新たな抵抗性クローンが見つかった後に、どのように採種園を改良すべきかについても検討しておく必要がある。現在のマツノザイセンチュウ抵抗性事業では、接種検定に合格したものだけを抵抗性マツとして供給している (戸田・寺田, 1997)。したがって、事業の効率性を考えると、母親および花粉親として寄与した場合に、次世代集団の接種生存率が低いクローンは除去し、新たなクローンと置き換えるべきである。本研究で、母親として寄与した実生苗の接種生存率では、田辺ーク 54 号の実生苗が特に低かった。このクローンの実生苗は、他の研究機関における接種試験でも生存率が低く (中野, 1995; 九州地区林業試験研究連絡協議会育種部会, 1999; 川内, 2000)、将来的には新たな抵抗性クローンと置き換えることにより、採種園から除去した方がよいと考えられた。また、小浜ーク 30 号、大瀬戸ー 12 号なども生存率が 50 % を下回っており、取り扱いも検討する必要があると考えられた。花粉親として寄与した実生苗の接種生存率では、夜須ーク 37 号が 30.3 % と極端に低く、このクローンも新たな抵抗性クローンと置き換えて、採種園から除去する必要があると考えられた。しかし、夜須ーク 37 号は、母親としては中程度の抵抗性を示した。このクローンの実生苗の遺伝組成を検討した結果、抵抗性が比較的高い津屋崎ーク 50 号が花粉親として大部分を占めていることが明らかとなった。一方、夜須ーク 37 号自身は花粉親として、どの家系にも比較的均等に寄与していた。したがって、夜須ーク 37 号の母親としての次世代抵抗性は、花粉親によって本来の抵抗性よりも引き上げられている可能性が示された。こ

のように、交配様式が著しく偏っている場合、自然交配実生苗に対する次代検定では、各クローンの正当な評価ができない可能性がある。

また、雑種クローンである小浜ーク 24 号は、自然交配苗の抵抗性が高いことから（宮原ら，1994；九州地区林業試験研究連絡協議会育種部会，1999）、このクローンが花粉親となった場合（戻し交雑種）の次世代抵抗性が注目されていた。しかし、本研究において小浜ーク 24 号が花粉親となった場合の次世代集団の接種生存率は、他のクロマツ家系と同程度であった。この現象は、クロマツ×タイワンアカマツの戻し交雑種がクロマツと同程度の低い抵抗性を示したこと（石井ら，1983；栗延・藤沢，1988）と一致していた。小浜ーク 24 号は、種子充実率が非常に低く母親としては種子生産にほとんど寄与していないこと（宮原ら，1998；川内，2000）、花粉親としての交配寄与は期待値の半分程度であったこと（宮原ら，1998；第 4 章第 3 節）、小浜ーク 24 号が花粉親となった場合の次世代抵抗性への寄与は他のクロマツ家系と同程度であったこと（第 4 章第 4 節）などから、本採種園における利用価値は低いと結論づけられた。

将来的な展望としては、未接種でも高い抵抗性を持つ、例えば接種した時の生存率が 90 %以上となるような交配組合せの探索とその利用も検討されるべきである。それには、各クローンのマツノザイセンチュウ抵抗性、さらに他の病虫害や潮風などに対する抵抗性などの特定組合せ能力を明らかにする必要がある。本研究では、144 の交配組合せに対して接種検定を行ったが、交配組合せごとの接種数が少なく、それぞれのマツノザイセンチュウ抵抗性の特定組合せ能力を把握するまでには至らなかった。したがって、特定組合せ能力の推定は今後の課題である。一方、波方ーク 73 号は、母親として寄与した場合と花粉親として寄与した場合のいずれにおいても、次世代集団の接種生存率が非常に高かった。したがって、このクローンを中心とした交配組合せは、有望であると考えられる。

これまでのマツノザイセンチュウ抵抗性育種は、抵抗性種苗の生産が第一の目的となっていたため、抵抗性の遺伝様式については未解明な部分が多い。マツノザイセンチュウ抵抗性の場合、既に 2 年生あるいは 3 年生苗に対する接種検定技術が確立しているため、遺伝解析を行う材料の確保が急務である。遺伝様式の解明には、雑種第 2 代（F2 苗）あるいは戻し交雑（B1）苗などの材料が必要であるが、人工交配を行ってこれらの材料を作出するには長い年月がかかる。しかし、本研究で開発した花粉親識別法を用いれば、既に設定された母樹別試験林の花粉親を識別することにより既に成熟期に入った F1 苗を得ることができるので、これらの個体から花粉を採取することにより、短期間に F2 苗あるい

は B1 苗の作出が可能である。それらを使つての QTL(Quantitative Trait Locus)解析などにより、遺伝様式の解明を行うことができると考えられる。